

Aus dem Institut
für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
Direktor: Prof. Dr. med Martin Aepfelbacher



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

**Epidemiologie phänotypischer und genetischer
Determinanten der Staphylokokken-Biofilmbildung
bei Endoprotheseninfektionen**

Dissertation
zum Erlangen des Doktorgrades der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Eike-Christian Burandt
aus Hamburg

Hamburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 31.01.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. I. Sobottka

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. P.-K. Kaulfers

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. W. Lehmann

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | Einleitung | 6 |
| 1.1 | <i>Einsatz von Fremdmaterialien in der modernen Medizin</i> | 6 |
| 1.2 | <i>Typische Erreger Fremdkörper-assoziiertes Infektionen</i> | 8 |
| 1.3 | <i>Typische Erreger bei Gelenk-Endoprotheseninfektionen</i> | 10 |
| 1.4 | <i>Aspekte Endoprothesen-assoziiertes Infektionen</i> | 11 |
| 1.5 | <i>Das Genus Staphylococcus</i> | 12 |
| 1.6 | <i>Staphylokokken und ihre Rolle im Rahmen Endoprothesen-assoziiertes Infektionen</i> | 14 |
| 1.7 | <i>Biofilmbildung</i> | 15 |
| 1.8 | <i>Staphylokokken-Biofilmbildung</i> | 16 |
| 1.8.1 | <i>Faktoren der primären Adhäsion</i> | 17 |
| 1.8.2 | <i>Faktoren der Biofilm-Akkumulation</i> | 20 |
| 2 | Zielsetzung der Arbeit | 26 |
| 3 | Material | 27 |
| 3.1 | <i>Chemikalien und Einwegartikel</i> | 27 |
| 3.1.1 | <i>Laborgeräte</i> | 27 |
| 3.1.2 | <i>Medien</i> | 29 |
| 3.2 | <i>Lösungen</i> | 30 |
| 3.3 | <i>Antiseren</i> | 31 |
| 3.4 | <i>Bakterienstämme</i> | 31 |
| 3.5 | <i>Oligonukleotide</i> | 32 |
| 3.6 | <i>Bakterienstammsammlung</i> | 35 |
| 3.7 | <i>Datenbanken und Programme</i> | 35 |

| | | |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4 | Methoden | 36 |
| 4.1 | <i>Allgemeine mikrobiologische Methoden</i> | 36 |
| 4.1.1 | Kultivierung von Bakterien | 36 |
| 4.1.2 | Biotypisierung | 36 |
| 4.1.3 | Biofilmtestung | 36 |
| 4.1.4 | Testung der Biofilmstabilität gegenüber Trypsin und DspB | 37 |
| 4.1.5 | Inhibition der Biofilmbildung bei <i>S. epidermidis</i> durch anti-Aap Domäne-B Antiserum | 38 |
| 4.1.6 | Semiquantitativer Koagglutinationstest zum Nachweis von PIA | 38 |
| 4.1.6.1 | <i>Staphylococcus aureus</i> Cowan I-Präparation | 38 |
| 4.1.6.2 | Herstellung des Koagglutinationsreagenz aus anti-PIA-Antikörpern und <i>Staphylococcus aureus</i> Cowan I | 38 |
| 4.1.6.3 | Durchführung des Koagglutinations-Assay | 39 |
| 4.1.7 | Nachweis von PIA durch Immuno-Dot-Blot | 39 |
| 4.1.7.1 | PIA-Präparation | 39 |
| 4.1.7.2 | Immunoblot (Western-Blot) | 40 |
| 4.2 | <i>Molekularbiologische Methoden</i> | 41 |
| 4.2.1 | Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA | 41 |
| 4.2.2 | Präparation chromosomaler Staphylokokken-DNA | 41 |
| 4.2.3 | Polymerasekettenreaktion (PCR) | 42 |
| 4.2.4 | PFGE (Pulsfeldgelelektrophorese) | 42 |
| 5 | Ergebnisse | 43 |
| 5.1 | <i>Etablierung einer Sammlung klinisch signifikanter Staphylokokken-Stämme aus Endoprotheseninfektionen</i> | 44 |
| 5.1.1 | Speziesidentifikation | 44 |
| 5.1.2 | Klonalitätsprüfung | 45 |
| 5.2 | <i>Molekulare Epidemiologie Biofilm-assoziiierter Gene und phänotypische Ausprägung der Biofilmbildung</i> | 47 |
| 5.2.1 | <i>S. aureus</i> : Molekulare Epidemiologie Biofilm-assoziiierter Gene und phänotypische Ausprägung der Biofilmbildung | 47 |
| 5.2.1.1 | Gene, die für Faktoren des primären Attachments kodieren | 47 |
| 5.2.1.2 | Gene, die für Faktoren der Akkumulation kodieren | 47 |
| 5.2.1.3 | Prävalenz von <i>mecA</i> | 48 |

| | | |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2.1.4 | Analyse des Biofilmphenotyps | 49 |
| 5.2.2 | <i>S. epidermidis</i> : Molekulare Epidemiologie Biofilm-assoziiierter Gene und phänotypische Ausprägung der Biofilmbildung | 51 |
| 5.2.2.1 | Gene, die für Faktoren des primären Attachments kodieren | 51 |
| 5.2.2.2 | Gene, die für Faktoren der Akkumulation kodieren | 52 |
| 5.2.2.3 | Weitere Virulenz-assoziierte Gene | 52 |
| 5.2.2.4 | Analyse des Biofilmphenotyps | 53 |
| 5.2.3 | Molekulare Epidemiologie und phänotypische Ausprägung der Biofilmbildung der <i>S. epidermidis</i> unabhängigen KNS Stämme | 58 |
| 6 | Diskussion | 61 |
| 6.1 | <i>Molekulare Epidemiologie Biofilm-assoziiierter Gene und phänotypische Ausprägung der Biofilmbildung</i> | 62 |
| 6.2 | <i>Protein-vermittelte Biofilmbildung bei S. epidermidis</i> | 67 |
| 6.2.1 | Polymorphismus der repetitiven Aap Domäne-B bei <i>S. epidermidis</i> | 69 |
| 6.2.2 | Prävalenz Virulenz-assoziiierter Gene in <i>S. epidermidis</i> unabhängigen KNS-Spezies | 70 |
| 7 | Zusammenfassung | 71 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 73 |
| 9 | Anhang | 90 |
| 9.1 | <i>Bakterienstammsammlung</i> | 90 |
| 9.2 | <i>Abkürzungsverzeichnis</i> | 94 |
| 9.3 | <i>Abbildungsverzeichnis</i> | 96 |
| 9.4 | <i>Curriculum vitae</i> | 98 |
| 9.5 | <i>Publikationsverzeichnis</i> | 99 |
| 9.6 | <i>Danksagung</i> | 100 |
| 9.7 | <i>Erklärung</i> | 101 |

1 Einleitung

1.1 Einsatz von Fremdmaterialien in der modernen Medizin

Die Verwendung von implantierbaren medizinischen Geräten und Instrumenten ist integraler Bestandteil der modernen Medizin. In vielen medizinischen Disziplinen dienen sie als intermittierender oder permanenter Ersatz von insuffizienten Organfunktionen. In diesem Zusammenhang sind insbesondere künstliche Gelenke, Herzklappen oder Augenlinsen zu nennen [Rupp and Archer, 1994]. Desweiteren leisten sie in Form von intravaskulären, Harnblasen- und Peritoneal-Kathetern sowie als Liquorableitungen einen obligaten Beitrag im Management kritisch kranker Patienten auf Intensivstationen. Eine Übersicht der verwendeten medizinischen Instrumente und deren Häufigkeit liefert Tab. 1.

Tab. 1 Implantierte Fremdmaterialien und die Häufigkeit ihrer Anwendung^a

| Implantat / Instrument | Anzahl der verwendeten Fremdmaterialien ^b |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Intravaskuläre Katheter peripher und zentralvenös | 150-200 Millionen/Jahr |
| Blasen-Katheter | 4-5 Millionen/Jahr |
| Liquorableitungen | > 80.000/Jahr |
| Herzschrittmacher | 115.000- 130.000/Jahr |
| Gefäßprothesen | > 60.000/Jahr |
| Prothetische Herzklappen | > 100.000/Jahr |
| Künstliche Herzen | 230 (1969-1991) |
| Urogenitale Prothesen | 150.000 total |
| Totale Hüftgelenksendoprothesen | 222.000/Jahr |
| Totale Kniegelenksendoprothesen | 110.000/Jahr |
| Zahnimplantate | 436.000/Jahr |

^a Nach [Anderson J. and Marchant R., 2000].

^b Die Zahlen basieren auf Daten aus den USA.

Die Implantation von medizinischen Fremdkörpern ist jedoch als zweischneidiges Schwert zu betrachten, da neben nützlichen Aspekten regelmäßig Komplikationen beobachtet werden [Darouiche, 2004]. Die gefürchtetste Komplikation ist eine Infektion des Fremdkörpers. Trotz der relativ niedrigen Infektionsrate von gewöhnlich 4 bis 6 Prozent treten in den USA pro Jahr geschätzte 240.000 Instrumenten-assoziierte Infektionen auf [Darouiche, 2004]. In Deutschland wird mit etwa 100.000 Fremdmaterial-assoziierten Infektionen jährlich gerechnet [Mack *et al.*, 2004].

Bei der Behandlung von Patienten mit Fremdmaterial-assoziierten Infektionen stehen zwei wesentliche Probleme im Vordergrund [Geipel and Herrmann, 2005; Sia *et al.*, 2005]. Zum einen stellt die Diagnose von Infektionen implantierter Fremdkörper den behandelnden Arzt wie auch den klinischen Mikrobiologen gleichermaßen vor große Probleme. Bei der Isolierung der ursächlichen Erreger aus dem Untersuchungsmaterial gilt es, zwischen Infektionserreger und einfacher Kontaminante zu unterscheiden [von *et al.*, 2005]. Dies kann angesichts der Gefahr, die Probe bei der Materialgewinnung insbesondere mit menschlicher Hautflora zu kontaminieren, im Einzelfall schwierig sein. *S. epidermidis*, der zu den am häufigsten nachzuweisenden Haut-Kommensalen in verschiedenen Körperregionen zählt, ist in diesem Zusammenhang in erster Linie zu nennen. Man kann davon ausgehen, dass 75 – 90 % der aus Patientenmaterial isolierten Koagulase-negativen Staphylokokken als Kontamination zu betrachten sind [Fidalgo *et al.*, 1990; Herwaldt *et al.*, 1996; Kirchoff and Sheagren, 1985; Kleeman *et al.*, 1993; Ringberg *et al.*, 1991; Weinstein *et al.*, 1983]. Durch Gewinnung mehrerer Materialien aus einem Untersuchungsareal lässt sich die Aussagekraft eines Keimnachweises erhöhen [Geipel and Herrmann, 2005]. Gegenwärtig gilt die wiederholte Anzucht eines (*S. epidermidis*-) Klons aus klinischen Proben als Goldstandard für die Definition eines klinisch signifikanten Isolates [Rupp and Archer, 1994]. Um eine klinische Relevanz schon bei einem einmaligen Keimnachweis zu erkennen, wurde in vielen Studien versucht, geeignete bakterielle Merkmale zu identifizieren, um kommensale Erreger von Infektionsstämmen unterscheiden zu können.

Neben der schwierigen Diagnose einer Fremdmaterial-assoziierten Infektion ist auch die Therapie ein bislang nur unbefriedigend gelöstes Problem [Rupp and Archer, 1994]. Hierfür ist zum einen die Tatsache verantwortlich, dass Infektionen in der Regel durch multiresistente, grampositive wie auch gramnegative Erreger verursacht werden. Folglich ist es häufig notwendig, Reserveantibiotika mit oftmals ungünstigen pharmakologischen Charakteristika einzusetzen. Zum anderen scheint es, dass das Wachstum an einem Implantat generell die Empfindlichkeit bakterieller Erreger gegenüber antibiotischen Substanzen herabsetzt. Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer, präventiver Strategien zur Vermeidung Fremdmaterial-assoziiierter Infektionen von herausragender Bedeutung.

Grundlage, zum Beispiel für die Entwicklung eines Impfstoffes, ist hierfür das Verständnis der Epidemiologie und molekularen Pathogenese Implantat-assoziiertes Infektionen.

1.2 Typische Erreger Fremdkörper-assoziiertes Infektionen

Grundsätzlich können eine Vielzahl von verschiedenen Bakterien-Spezies Fremdmaterial-assoziiertes Infektionen hervorrufen. Charakteristisch ist, dass es sich in der Regel um endogene Infektionen handelt, das heißt, dass die Erreger der Patienten-eigenen Flora entstammen. Somit können in Abhängigkeit von der Implantat-Lokalisation typische Erreger erwartet werden. Die Tab. 2 liefert einen Überblick über die Verteilung der bei Fremdkörper-assoziiertes Infektionen isolierten Erreger sowie deren potentiellen Ursprung.

Tab. 2 Epidemiologie Implantat-assoziiertes Infektionen: typische Erreger^a

| Spezies | Endogenes Reservoir |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Grampositive Kokken | |
| <i>S. aureus</i> | Nasopharynx (40 – 50 %) |
| <i>S. epidermidis</i> | Haut, Respirations- oder Gastrointestinaltrakt |
| Gramnegative Stäbchen | |
| <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Enterobactersp.</i> , <i>Morganella sp.</i> , <i>Serratia sp.</i>) | Gastrointestinaltrakt |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Nosokomial, Gastrointestinaltrakt |
| Pilze | |
| <i>Candida-spp.</i> | Respirations-, Gastrointestinal- und weiblicher Genitaltrakt |

^a Nach [Anderson J. and Marchant R., 2000].

Die gramnegativen Stäbchenbakterien, insbesondere die *Enterobacteriaceae*, sind genau wie die nosokomial erworbenen *Pseudomonas aeruginosa* regelmäßige Erreger Fremdkörper-assoziiertes Infektionen und zeichnen sich durch eine ausgesprochene Virulenz aus [Ballard *et al.*, 1992; Bandyk and Esses, 1994; Fang *et al.*, 1993; Pfeiffer *et al.*, 1994]. Pilze wie *Candida spp.* und *Aspergillus spp.* sind in nur 8 % der Fälle ätiologisches Agens von Fremdkörper-

asoziierten Infektionen. Sie sind aber aufgrund ihrer hohen Mortalität von etwa 50 % extrem gefürchtet [Randrup, 1995].

Die am häufigsten isolierten Organismen im Kontext Fremdkörper-assoziiierter Infektionen sind Staphylokokken, insbesondere *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*. Aus diesem Grund sind beide Spezies, vor allem aber *S. epidermidis*, in der letzten Dekade zu den herausragenden Verursachern nosokomialer Infektionen avanciert [Rupp and Archer, 1994].

1.3 Typische Erreger bei Gelenk-Endoprotheseninfektionen

Für die Pathogenese von Infektionen künstlicher Gelenke wird angenommen, dass die Prothese hauptsächlich während der Implantation durch Einschleppung von Keimen der physiologischen Standortflora der Haut infiziert wird [Frank *et al.*, 2004]. Alternativ kann es auch zu einer Kolonisation *per continuitatem* durch direkten Kontakt zu einer benachbarten infizierten Stelle oder schließlich durch hämatogene oder lymphogene Aussaat des Erregers kommen [Geipel and Herrmann, 2005]. Entsprechend der typischen Infektionsroute sind es im Kontext der Endoprothesen-Infektionen *Staphylococcus*-Spezies, vornehmlich *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*, die am häufigsten aus infiziertem Gewebe isoliert werden [Lentino, 2003]. Von polymikrobiellen Infektionen wird in 12 - 19 % der Fälle berichtet. Aerobe gramnegative Keime und anearobe Erreger werden weniger häufig isoliert. Bemerkenswert ist, dass in bis zu 11 % der Fälle die mikrobiologische Ursache der Infektion unbekannt bleibt. Die Tab. 3 illustriert die wichtigsten Infektionserreger Endoprothesen-assoziiierter Infektionen.

Tab. 3 Häufigkeit verschiedener Bakterienspezies bei Endoprotheseninfektionen^a

| Spezies | Häufigkeit in % |
|-----------------------------------|-----------------|
| <i>S. aureus</i> | 20-25 |
| Koagulase negative Staphylokokken | 20-30 |
| Polymikrobiell | 12-19 |
| Gramnegative Bazilli | 6-11 |
| Streptokokken | 8-10 |
| Anaerobier | 4-10 |
| <i>Enterococcus</i> Spezies | 3 |
| Andere oder unbekannt | 2-11 |

^a Nach [Widmer, 2001]

1.4 Aspekte Endoprothesen-assoziiierter Infektionen

Endoprothesen-assoziierte Infektionen ereignen sich nur bei einem geringen Prozentsatz der Prothetikempfänger. Bedingt durch die schwierige Therapie und dem daraus resultierenden signifikanten Anstieg der Hospitalisations-bezogenen Morbidität und Mortalität, stellen Gelenksprothesen-assoziierte Infektionen dennoch eine bedeutende und gefürchtete Bedrohung in der modernen Medizin dar [Lentino, 2003]. Zudem stellen Infektionen künstlicher Gelenke eine ökonomische Belastung dar: die geschätzten Behandlungskosten einer Endoprotheseninfektion belaufen sich in den USA auf 50.000 bis 60.000 Dollar [Sculco, 1995].

Das Risiko für eine Infektion nach einem primären totalen Kniegelenksersatz ist mit 1 – 2 % höher als nach einem primären totalen Hüftgelenksersatz (0.3 -1.3 %) [Lidgren *et al.*, 2003; Hanssen and Rand, 1999]. Für Revisions-Operationen liegen die Infektionsraten deutlich höher (Hüftendoprothesen, 3 %; Knieendoprothesen, 6 %). Patienten mit rheumatoider Arthritis haben, verglichen mit Osteoarthritis-Patienten, ebenfalls ein gesteigertes Infektionsrisiko (2,2 % vs. 1,2 %) [Robertsson *et al.*, 2001].

Man unterscheidet zwischen zwei Verlaufsformen der Endoprothesen-assoziierten Infektion. Von der „early onset“-Infektion, die Tage bis wenige Wochen nach Einbringen des Fremdmaterials beginnt, wird die „late onset“-Infektion, bei der Krankheitssymptome erst im Verlauf von Monaten auftreten [Kloos and Bannerman, 1994], abgegrenzt.

Das klinische Erscheinungsbild der Prothesen-Infektionen ist sehr variabel. Es werden sowohl akut septische als auch latente Klinikverläufe beobachtet. Ein regelmäßig beobachtetes Symptom im Rahmen von Infektionen künstlicher Gelenke sind Schmerzen im Implantatbereich, die bei über 90 % der Fälle zu verzeichnen sind [Sia *et al.*, 2005]. Zudem können sich zusätzlich Wundheilungsstörungen, Überwärmung oder eitriger Ausfluss manifestieren. Ein bis zum Gelenk ziehender Fistelgang gilt als definitives Zeichen einer Protheseninfektion, ist aber längst nicht immer vorhanden [Sia *et al.*, 2005].

Die chronischen, klinisch milden Infektionen, die sich in der Regel einige Monate bis zwei Jahre nach der Implantation ereignen, repräsentieren einen Großteil der Fälle. Gerade diese Infektionen sind eine große Herausforderung für den Kliniker, da eine chronische Protheseninfektion von einer aseptischen mechanischen Lockerung des Implantats differenziert werden muss. Die Diagnostik im Rahmen von Infektionen künstlicher Gelenke erweist sich hierbei als außerordentliches Problem. Neben klinischen Aspekten werden klinisch-chemische wie auch mikrobiologische Untersuchungen zur Anwendung gebracht [Widmer, 2001; Sia *et al.*, 2005]. Die gebräuchlichsten klinisch-chemischen Screeningparameter im Rahmen Prothesen-

assoziierter Infektionen sind die Leukozytenzahl, die Blutkörperchengeschwindigkeit (BSG) und das C-reaktive Protein. Diese Parameter liefern jedoch keine zuverlässige Aussage darüber, ob ein infiziertes Gelenk vorliegt oder nicht [Cuckler *et al.*, 1991; Tsukayama *et al.*, 1996; Sanzen and Sundberg, 1997; Spangehl *et al.*, 1999; Spangehl *et al.*, 1998]. Für den Erregernachweis existieren derzeit keine spezifischen serologischen Marker. Damit rückt der kulturelle Nachweis des ursächlichen Erregers in den Mittelpunkt der mikrobiologischen Diagnostik. Dieser wird als zentraler Aspekt im Diagnosemanagement gesehen, denn einerseits wird auf diese Weise die Infektion gesichert, und andererseits kann nur durch die Kenntnis des ursächlichen Erregers und einer detaillierten Resistenztestung eine gezielte antibiotische Therapie erfolgen. Die Kenntnis des Resistenzprofils der Erreger ist auch deshalb von zunehmendem Interesse, da in den letzten Jahren vermehrt Stämme mit multiplen Antibiotikaresistenzen, insbesondere gegen β -Laktam-Antibiotika, registriert wurden [Bailey *et al.*, 1990; Frebourg *et al.*, 2000; Grosserode and Wenzel, 1991]. Eine frühzeitige und aggressive antimikrobielle Therapie periprothetischer Infektionen ist von entscheidender Bedeutung, bevor eine umfangreiche Destruktion und Nekrose der beteiligten Strukturen einsetzt [Geipel and Herrmann, 2005]. Für eine suffiziente Behandlung ist im Regelfall, selbst wenn der Erreger *in vitro* sensibel für das verwendete Antibiotikum erscheint, ein kombiniertes konservativ-chirurgisches Vorgehen erforderlich [Lentino, 2003; Geipel and Herrmann, 2005].

Wie bereits beschrieben, stellt bei der Erregeridentifizierung die Differenzierung zwischen klinisch signifikanten Isolaten und Kontaminanten, die während der Materialgewinnung die Probe verunreinigen können, ein Hauptproblem dar. Für die Definition eines klinisch signifikanten Isolates gilt gegenwärtig der wiederholte Nachweis eines Klons aus klinischen Proben als Goldstandard [Rupp and Archer, 1994].

1.5 Das Genus *Staphylococcus*

Staphylokokken sind 0,5 bis 1,5 μm große, grampositive, haufenförmig wachsende, fakultativ anaerobe, unbewegliche, nicht sporenbildende Kokkenbakterien, welche eine Katalase-Aktivität besitzen. Typische Habitate von Staphylokokken sind die Haut und Hautanhangsgebilde [Kloos, 1997; Kloos and Bannerman, 1994]. Die höchste Populationsdichte mit $10^3 - 10^6$ CFU/cm² findet sich dabei an den Ausführungsgängen von Talg- und Schweißdrüsen sowie auf den Schleimhäuten von natürlichen Körperöffnungen [Kloos and Bannerman, 1994; Noble, 1997]. Das Genus *Staphylococcus* gehört neben den Gattungen *Micrococcus*, *Planococcus* und *Stomatococcus* zur Familie der *Micrococcaceae*. Innerhalb dieser Familie

werden zwischen den einzelnen Gattungen große Unterschiede bezüglich des G/C-Gehaltes der chromosomalen DNA beobachtet. Die Gattungen *Staphylococcus* und *Planococcus* fallen hierbei durch einen relativ niedrigen G/C-Gehalt von 30 bis 39 % auf, wohingegen die Gattungen *Micrococcus* und *Stomatococcus* einen G/C-Gehalt von 66 bis 77 % aufweisen [Kloos, 1997].

Innerhalb der Gattung können durch biochemische, molekularbiologische und physiologische Methoden die verschiedenen Staphylokokkenspezies und Subspezies differenziert werden. Dies erfolgt durch Beurteilung der Koloniemorphologie, des Antibiogramms, der spezifischen Enzymausstattung und der Fähigkeit zur Säurebildung aus verschiedenen Zuckern. Zusätzlich wird eine eingehendere Differenzierung durch chemische Analysen der Aminosäurezusammensetzung der Interpeptidbrücke des Peptidoglycans, der Teichonsäuren der Zellwand sowie der zellulären Fettsäurekomponenten ermöglicht. Genetische Methoden zum Nachweis von Spezies-spezifischen DNA-Sequenzen werden ebenfalls zur detaillierteren Differenzierung genutzt. Mit diesen Methoden können zurzeit 43 Staphylokokkenspezies unterschieden werden, von denen einige noch auf Subspeziesebene differenziert werden, so dass insgesamt 64 Taxa bekannt sind [Devriese *et al.*, 2005; Kloos *et al.*, 1997; Kloos *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 1998; Pantucek *et al.*, 2005; Place *et al.*, 2003; Probst *et al.*, 1998; Spargser *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 1999; Trulzsch *et al.*, 2002; Vernozy-Rozand *et al.*, 2000].

Durch den Nachweis der Prothrombin-aktivierenden Koagulase werden die beim Menschen vorkommenden Staphylokokken in Koagulase-positive und Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) unterteilt [Sperber and Tatini, 1975]. Die einzige bekannte Koagulase-positive Spezies mit human-pathogener Relevanz ist *Staphylococcus aureus*. Wie auch *S. aureus* werden die meisten der Koagulase-negativen Staphylokokken Spezies als residente oder temporäre Hautflora beim Menschen isoliert. Dabei weisen einige Spezies eine deutliche Präferenz bezüglich der besiedelten Körperregion auf. *Staphylococcus capitis* wird beispielsweise fast ausschließlich auf der behaarten Kopfhaut isoliert, während *Staphylococcus auricularis* im äußeren Gehörgang und *Staphylococcus haemolyticus* sowie *Staphylococcus hominis* vornehmlich im Bereich der apokrinen Schweißdrüsen gefunden werden. *Staphylococcus epidermidis* dagegen kommt auf der gesamten Körperoberfläche vor und ist die am häufigsten von der Haut des Menschen isolierte Staphylokokkenspezies [Kloos, 1997; Kloos and Bannerman, 1994; Noble, 1997].

1.6 Staphylokokken und ihre Rolle im Rahmen Endoprothesen-assoziiierter Infektionen

Wie bereits in Abschnitt 1.3. beschrieben, sind *S. aureus* und *S. epidermidis* die dominierenden Erreger bei Endoprothesen-assoziierten Infektionen. Zwei wesentliche Gründe sind hierfür verantwortlich. Zum einen sind beide Spezies, insbesondere *S. epidermidis*, hochprävalente Kommensalen der Haut. Zum anderen sind sie mit geno- wie auch phänotypischen Determinanten ausgestattet, die die Kolonisation von implantierten Fremdmaterialien begünstigen. Es blieb lange Zeit unklar, welche Faktoren für den Erfolg von *S. aureus* und *S. epidermidis* im Rahmen Fremdkörper-assoziiierter Infektionen verantwortlich sind. Frühe Untersuchungen zeigten als herausragendes Merkmal, dass auf explantierten Fremdmaterialien insbesondere *S. epidermidis* in Form festhaftender, mehrlageriger Zellaggregate nachgewiesen werden kann [Christensen *et al.*, 1982; Peters *et al.*, 1982]. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von infizierten Kathetern zeigten, dass einzelne Bakterienzellen innerhalb der mehrlagerigen Bakterienzellorganisation in eine amorphe Grundsubstanz eingebettet sind. Auffälliges Merkmal dieser Organisationsform ist, dass nur ein Teil der Bakterien direkten Kontakt zu der besiedelten Oberfläche aufweist. Es wurde daher angenommen, dass die extrazelluläre Matrix durch Vermittlung interzellulärer Adhäsion entscheidend an der Pathogenese Fremdmaterial-assoziiierter Infektion beteiligt sein muss [Marrie and Costerton, 1984; Peters *et al.*, 1981]. Dieses Phänomen wurde zunächst als Schleimbildung bezeichnet, heute ist aber allgemein der Begriff Biofilmbildung üblich [Gotz *et al.*, 2000; Mack, 1999].

Im Falle von *S. epidermidis* weisen verschiedene epidemiologische Studien eine enge Assoziation zwischen der klinischen Relevanz eines *S. epidermidis* Isolates und dessen Fähigkeit zur Biofilmbildung nach. Biofilmbildende Stämme finden sich signifikant häufiger bei Fremdkörper-assoziierten Infektionen als biofilmmegative [Christensen *et al.*, 1983; Davenport *et al.*, 1986; Deighton and Balkau, 1990; Dunne, Jr. *et al.*, 1987; Ishak *et al.*, 1985; Ziebuhr *et al.*, 1997]. Zudem weisen tierexperimentelle Daten auf einen Zusammenhang zwischen der Fähigkeit zur Biofilmbildung und der Virulenz des Erregers hin [Rupp *et al.*, 1999a; Rupp *et al.*, 1999b; Rupp *et al.*, 2001]. Das Versagen einer alleinigen antibiotischen Therapie solcher Infektionen korrelierte ebenfalls mit dem Vorhandensein eines biofilmpositiven Phänotyps bei den isolierten Infektionsstämmen [Davenport *et al.*, 1986; Diaz-Mitoma *et al.*, 1987; Younger *et al.*, 1987].

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung gilt als der entscheidende Pathogenitätsfaktor von *S. aureus* und *S. epidermidis* im Rahmen von Fremdkörper-assoziierten Infektionen. Aus diesem Grund

ist das Verständnis über den komplexen Prozess der Biofilmbildung von übergeordnetem Interesse.

1.7 Biofilmbildung

Biofilmbildung ist eine bei Bakterien weit verbreitete Wachstumsform. Der Begriff Biofilm kennzeichnet eine Gemeinschaft von Mikroorganismen, die an einer Oberfläche adhärirt und, umgeben von einer selbst synthetisierten polymeren Matrix, sukzessiv akkumuliert [Costerton *et al.*, 1999; O'Toole *et al.*, 2000]. Vielfach sind in der Umwelt unterschiedliche Spezies gemeinsam in einem Biofilm organisiert, es gibt aber auch Monospeziesbiofilme. Diese stehen im medizinischen Bereich als Ursache klinisch relevanter Biofilm-assoziiierter Infektionen im Vordergrund [Costerton *et al.*, 1999]. Ein Biofilm stellt eine komplexe biologische Architektur dar, die den Bakterien einerseits günstige Lebensbedingungen und andererseits Schutz vor Umwelteinflüssen bietet [Costerton *et al.*, 2003]. Nach initialer Adhärenz der Bakterien an eine Oberfläche bilden sich Mikrokolonien, die in der Folge durch Zellaggregation, eingebettet in eine Exopolysaccharidmatrix, zum eigentlichen Biofilm akkumulieren [Stoodley *et al.*, 2002] (Abb.1, Abb. 2).

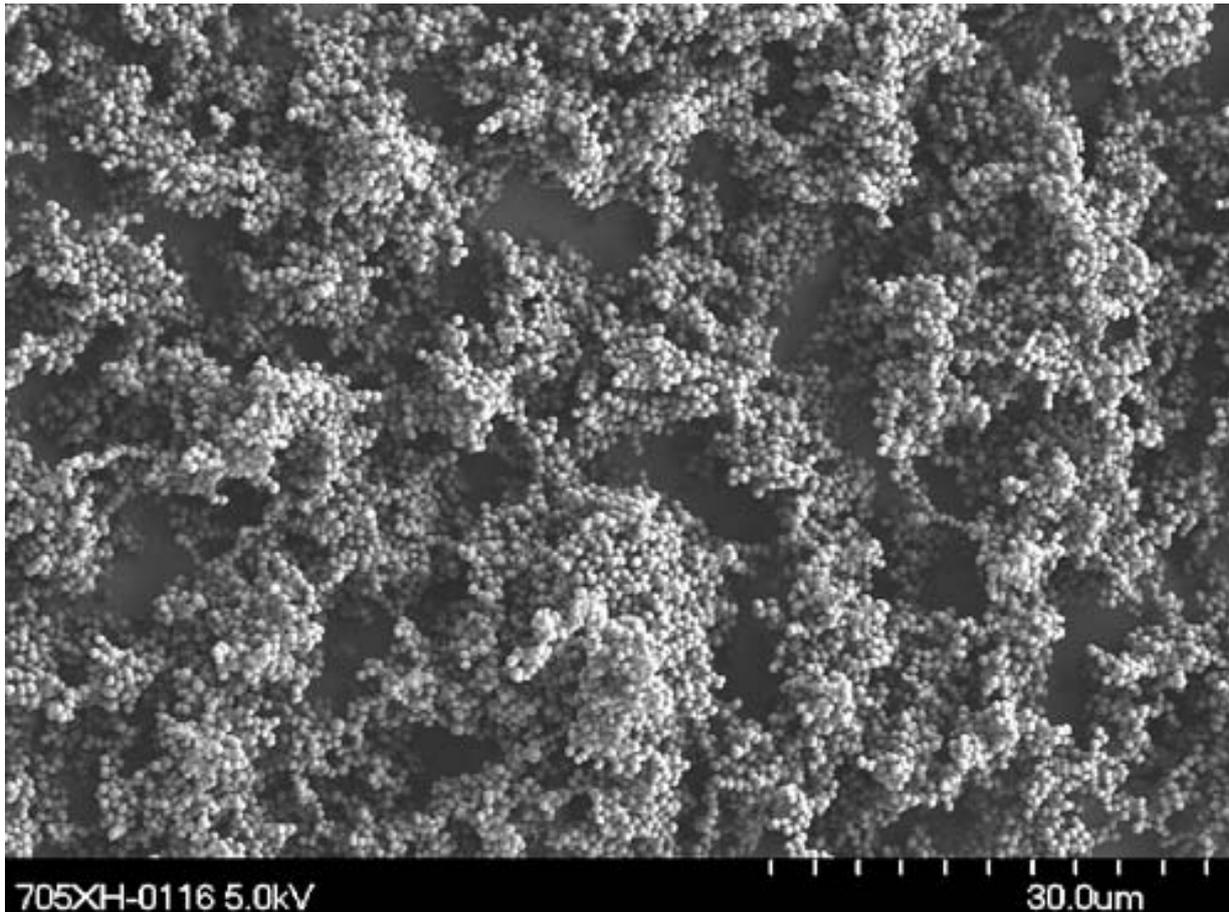


Abb.1 Elektronenmikroskopisches Bild eines von *S. epidermidis* 1457 synthetisierten Biofilms auf rostfreiem Stahl nach 18 stündiger Inkubation [Mack et al., 2006b]

Durch die Organisation in Biofilmen sind Bakterien in der Lage, sich der Immunabwehr des Menschen zu entziehen [Götz, 2004; Foster, 2005]. Das wirtseigene Abwehrsystem schafft es nicht, die Bakterien innerhalb des Biofilms suffizient zu bekämpfen [Cochrane *et al.*, 1988; Costerton *et al.*, 2003; Heinzelmann *et al.*, 1997; Knobloch *et al.*, 2002b; Vuong *et al.*, 2003]. Auch für Antibiotika stellt der Biofilm eine Barriere dar. Zum einen können manche Wirkstoffe schlecht durch diesen diffundieren, zum anderen wachsen Bakterien innerhalb des Biofilms vielfach äußerst langsam, was die fehlende Suszeptibilität gegenüber bestimmten Antibiotikaklassen erklärt [Costerton *et al.*, 1999; Knobloch *et al.*, 2002b].

1.8 Staphylokokken-Biofilmbildung

In Analogie zu anderen Bakterien weist die Biofilmbildung von Staphylokokken charakteristischerweise eine Vierphasen-Kinetik auf [Costerton *et al.*, 1999] (Abb. 2).

In der primären Bindungsphase etablieren die Bakterien mit einer Reihe von unspezifischen und spezifischen Faktoren Kontakt zu der Oberfläche, beziehungsweise zu den dort gebunde-

nen extrazellulären Matrixbestandteilen [Götz, 2002; Mack *et al.*, 2006b]. Die zweite Phase ist durch die Akkumulation der Bakterien charakterisiert, die sich so in mehrschichtigen Zellschichten organisieren. Hierbei reift das bakterielle Zellkonsortium zu einer komplexen Biofilm-Architektur, in welcher ein Großteil der Bakterien keinen direkten Kontakt zur Oberfläche hat, aber infolge interzellulärer Adhäsionsmechanismen im Zellgefüge verbleibt und pilzartige Strukturen sowie Kanäle ausbildet, die der Nährstoffversorgung der Bakterien zu dienen scheinen [Mack *et al.*, 2006b]. Während der vierten Phase der Biofilmbildung können sich einzelne Bakterien von der Zellgemeinschaft lösen, um so möglicherweise neue Habitate zu besiedeln [Vadyvaloo and Otto, 2005].

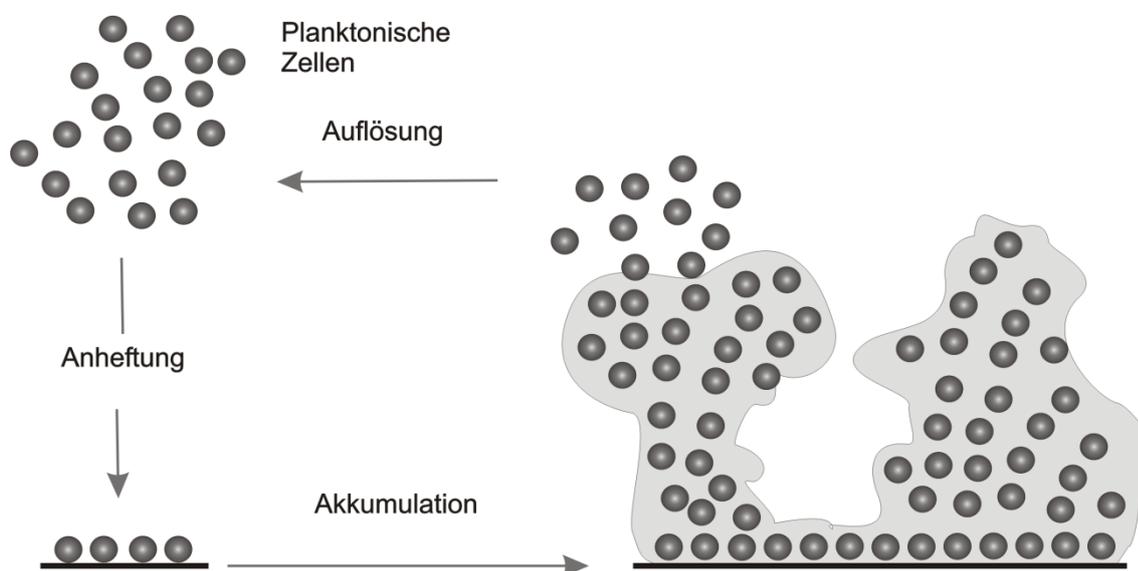


Abb. 2 Schematische Darstellung des Modells der Biofilmbildung in *S. epidermidis* nach [Mack *et al.*, 2006a].

1.8.1 Faktoren der primären Adhäsion

Als entscheidender Schritt in der Pathogenese Endoprothesen-assoziiierter Infektionen ist die initiale Kolonisation des Fremdkörpers anzusehen, bei der eine Reihe von spezifischen und unspezifischen Faktoren eine Rolle spielt (zusammengefasst in Tab. 4). Die Staphylokokken können dabei direkt an der nativen Oberfläche des Implantats adhären oder an wirtseigenen Plasmaproteinen, extrazellulären Matrixproteinen und Koagulationsprodukten, durch welche die Fremdkörperoberfläche konditioniert wurde.

Die Interaktion zwischen Bakterium und nativem Fremdkörper wird initial im Wesentlichen durch nicht spezifische, physiko-chemische Eigenschaften des Implantats und der Bakterien-

zelle bestimmt. Sehr wichtig für die primäre Bindung an einer nativen Oberfläche ist beispielsweise die Hydrophobizität der Staphylokokken [Mack *et al.*, 2006b;Götz, 2004]. Sowohl für *S. aureus* als auch für *S. epidermidis* wurden Faktoren beschrieben, die für die Adhäsion an nativen Oberflächen von Bedeutung sind.

Bei *S. epidermidis* ist das Autolysin AtlE, neben seiner Rolle im Zellwandmetabolismus, aktiv an der Bindung auf unkonditionierten Oberflächen beteiligt. In einem Rattenmodell für Infektionen von zentralvenösen Kathetern präsentierte eine isogenetische *atlE*-Mutante, die unfähig war AtlE zu synthetisieren, eine abgeschwächte Virulenz [Rupp *et al.*, 2001]. Da AtlE zudem eine spezifische Vitronektin-Bindungsaktivität besitzt, übernimmt es bei der primären Adhäsion für *S. epidermidis* eine Doppelfunktion. Das erst vor kurzem beschriebene Autolysin/Adhäsion Aae vermittelt eine Bindung an Fibrinogen, Fibronektin und Vitronektin [Heilmann *et al.*, 2003]. Das 220 kDa große *S. epidermidis* Oberflächenprotein 1 (*Staphylococcal surface protein Ssp 1*) findet sich in einer Fimbrien-ähnlichen Struktur auf der Zelloberfläche von *S. epidermidis* und vermittelt eine Bindung an Polystyrol [Timmerman *et al.*, 1991;Veenstra *et al.*, 1996].

Im Rahmen der Suche nach *S. aureus* Mutanten, die überempfindlich gegenüber positiv geladenen antimikrobiellen Peptiden sind, wurden Mutanten mit einer veränderten Teichonsäurestruktur isoliert [Weidenmaier *et al.*, 2003]. Die Mutation war im *dtlA*-Operon lokalisiert und führte zu einem D-Alanin-Verlust der Teichonsäuren. Diese *dtlA*-Mutante ist biofilmm negativ, obwohl sie immer noch interzelluläre Adhäsionsfaktoren exprimiert. Die Adhäsion an Polystyrol ist bei der *dtlA*-Mutante beeinträchtigt, genau wie bei der beschriebenen *atlE*-Mutante von *S. epidermidis* [Weidenmaier *et al.*, 2003].

Ausgehend von der Beobachtung, dass Materialeigenschaften entscheidenden Einfluss auf die Adhärenz von Staphylokokken nehmen, wurde versucht, die Entstehung Fremdmaterial-assoziiertes Infektionen durch Entwicklung antiadhäsiver Biomaterialien zu verhindern. Dieser Versuch scheiterte jedoch weitestgehend. Die Ursache hierfür ist, dass die Fremdkörperoberfläche nach Implantation rasch durch wirtseigene extrazelluläre Matrixmoleküle (EZM) wie zum Beispiel Albumin, Fibronektin, Fibrinogen, Kollagen und Vitronektin beschichtet wird [Espersen *et al.*, 1994;Kloos and Bannerman, 1994;Vaudaux *et al.*, 1989]. Auch zelluläre Elemente, insbesondere Thrombozyten [Wang *et al.*, 1993], aber auch Fibroblasten und Endothelzellen können proadhäsive Faktoren darstellen.

Staphylokokken können mit den so konditionierten Oberflächen mittels spezifischer Adhäsine wechselwirken. Insbesondere für *S. aureus* wurde bereits eine große Anzahl Zellwand-assoziiertes Proteine mit EZM-Bindungsaktivität charakterisiert. In Hinblick auf ihre biologi-

sche Aktivität werden sie in der Familie der MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) zusammengefasst [Foster and Höök, 1998]. Klassische MSCRAMM Prototypen von *S. aureus* sind das Fibronektin bindende Protein A (FnbA), ein Kollagen bindendes Protein (CNA) sowie das Fibrinogen adhärierende Protein Clumping-Faktor A (ClfA). Neben spezifischen Adhäsinen, die neben genannten Matrix- und Plasma-proteinen auch Elastin, Laminin, Prothrombin, Thrombospondin und Vitronektin binden, exprimiert *S. aureus* auch EZM-bindende Proteine mit breiterer Spezifität (Tab. 4). Diese Proteine (u.a. Efb, *extracellular fibrinogen binding protein*; Emp, *ECM binding protein*; Eap, *extracellular adhesiv protein*) wurden kürzlich in einer als SERAM (*secretable expanded repertoire adhesive proteins*) bezeichneten Gruppe vereint [Chavakis *et al.*, 2005]. In verschiedenen Tiermodellen konnte die Rolle der EZM-bindenden Proteine in der Pathogenese Staphylokokken-assoziierten Infektionen demonstriert werden [Götz, 2004]. Die an der primären Bindung konditionierter Oberflächen beteiligten bakteriellen Adhäsine haben ein beachtliches Aufsehen erlangt, da mit ihnen möglicherweise ein Ansatz für eine erfolgreiche Prävention Fremdkörper-assoziierten Infektionen zur Verfügung steht [Götz, 2004].

Wie der Vergleich der sequenzierten Genome von *S. aureus* und *S. epidermidis* RP62A zeigte, besitzt *S. epidermidis* signifikant weniger spezifische EZM-Adhäsine als *S. aureus* [Gill *et al.*, 2005]. Das über 1 MDa große Embp bindet spezifisch Fibronektin [Williams *et al.*, 2002] und ist in einem Großteil der klinischen *S. epidermidis* Isolate präsent [Rohde *et al.*, 2004; Rohde *et al.*, 2007]. Ein weiteres an der Bindung von Matrixproteinen beteiligtes Oberflächenprotein von *S. epidermidis* ist das Fibrinogen bindende Protein Fbe [Hartford *et al.*, 2001; Nilsson *et al.*, 1998; Pei and Flock, 2001; Pei *et al.*, 1999]. Fbe zeigt Homologien zur *sdrCDE*-Familie der Oberflächenrezeptoren von *S. aureus* [Josefsson *et al.*, 1998]. Für die extrazelluläre *S. epidermidis* Lipase GehD konnte gezeigt werden, dass sie zusätzlich als Zellwand-assoziiertes Kollagen-Adhäsion fungiert [Bowden *et al.*, 2002]. Zudem wurde gezeigt, dass Lipoteichonsäuren an der Bindung von Fibrin-Thrombozytenthromben und Fibronektin beteiligt sind [Chugh *et al.*, 1990; Hussain *et al.*, 2001].

Tab. 4 Funktionell an den einzelnen Phasen der Staphylokokken-Biofilmbildung beteiligte Faktoren

| Biofilmbildungs-Phase | Gene | Funktion der Genprodukte | |
|-----------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| Primäre Adhäsion | | | |
| <i>S. aureus</i> | <i>clfA, clfB</i> | Bindet Fibrinogen | |
| | <i>fnbA, fnbB</i> | Bindet Fibronectin und Fibrinogen | |
| | <i>cna</i> | Kollegen-Adhäsion | |
| | <i>spa</i> | Protein A; bindet Immunglobuline und von Willebrand-Faktor | |
| | <i>bbp</i> | Bindet Bone-Sialoprotein | |
| | <i>ebpS</i> | Elastin-Adhäsion | |
| | <i>sdrC</i> | Vermeintliches Adhäsion mit unbekanntem Liganden; strukturelle Homologie mit <i>clfA</i> und <i>clfB</i> | |
| | <i>sdrD</i> | Vermeintliches Adhäsion mit unbekanntem Liganden; strukturelle Homologie mit <i>clfA</i> und <i>clfB</i> | |
| | <i>sdrE</i> | Homolog zu <i>bbp</i> ; bindet vermeintlich Bone-Sialoprotein | |
| | <i>sasE (isdA)</i> | Bindet Fibronectin und Fibrinogen | |
| | <i>sasG (aap-homolog)</i> | Adhärert an desquamierten nasalen Epithelzellen | |
| | <i>eap/map</i> | Bindet Fibronectin, Fibrinogen und Prothrombin; fördert Bindung an interzellulärem Adhäsionsmolekül 1 (ICAM1); gehört der der SERAM-Familie an | |
| | <i>efb</i> | Bindet Fibrinogen und Komplementfaktor C3; gehört der SERAM-Familie an | |
| | <i>ebp</i> | Bindet Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin und Kollagen; gehört der SERAM-Familie an | |
| | <i>S. epidermidis</i> | <i>ebh</i> | Bindet Fibronectin |
| | | <i>fbe/sdrG</i> | Fibrinogen-Adhäsion |
| <i>embp</i> | | Homolog zu <i>ebh</i> von <i>S. aureus</i> ; Fibronectin-Adhäsion | |
| <i>atlE</i> | | Fördert die Bindung an Polystyrol; Vitronectin-Adhäsion | |
| <i>aae</i> | | Fördert die Bindung an Polystyrol | |
| <i>gehD</i> | | Bindet Kollagen | |
| Biofilm-Akkumulation | | | |
| <i>S. aureus</i> | <i>icaADBC</i> | Kodiert den Syntheseapparat des interzellulären Polysaccharid Adhäsion (PIA) | |
| | <i>bap</i> | In interzelluläre Adhäsion involviert, beeinträchtigt die primäre Adhäsion | |
| <i>S. epidermidis</i> | <i>icaADBC</i> | Kodiert den Syntheseapparat des interzellulären Polysaccharid Adhäsion (PIA) | |
| | <i>aap</i> | An interzelluläre Adhäsion und Polysaccharid-unabhängiger Biofilm-Akkumulation beteiligt | |

1.8.2 Faktoren der Biofilm-Akkumulation

Eine wesentliche Voraussetzung für die Akkumulation in einem mehrschichtigen Biofilm sind Faktoren, die interzelluläre Adhäsion vermitteln und damit die Biofilmarchitektur stabilisieren.

Als wesentlich hierfür wird sowohl bei *S. epidermidis* als auch bei *S. aureus* das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion (*polysaccharid intercellular adhesin* PIA) angesehen. PIA besitzt

nicht nur interzelluläre adhäsive Aktivität, sondern fungiert zusätzlich als Hämagglutinin [Mack *et al.*, 1999].

PIA ist ein lineares Homoglykan, bestehend aus durchschnittlich 130 β -(1,6)-verknüpften N-Acetylglucosamin-Einheiten [Mack *et al.*, 1996a] (Abb. 3 A).

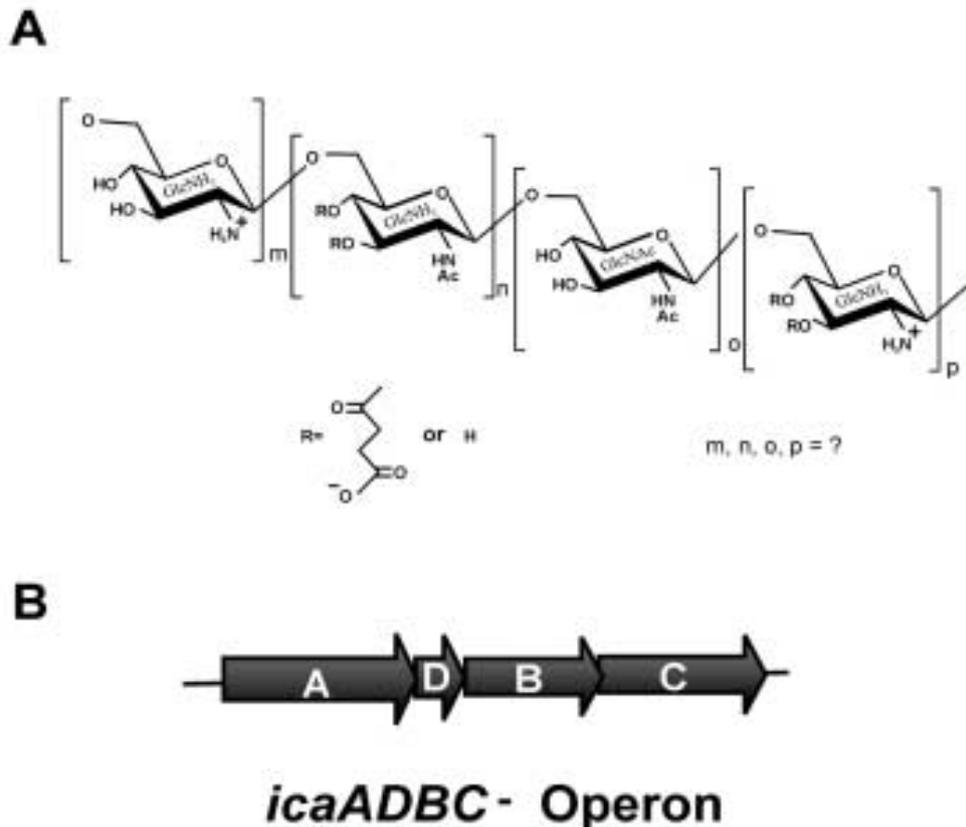


Abb. 3 (A) Schematische Darstellung des interzellulären Polysaccharid-Adhäsins (*polysaccharid intercellular adhesin* PIA). Das Rückgrat des unverzweigten Polysaccharids besteht aus durchschnittlich 130 β -(1,6)-verknüpften N-Acetylglucosamin-Resten. PIA trägt ca. 15 % deacetylierte Reste und Ester-gebundene Succinate. Die Präsenz von sowohl negativen als auch positiven Ladungen ist offensichtlich für die interzellulären Adhäsionseigenschaften von PIA von funktioneller Relevanz. **(B) Schematische Darstellung des *ica*-Lokus,** der den PIA-Syntheseapparat kodiert. Nur die Expression aller 4 Gene führt zur Synthese eines funktionell aktiven Moleküls.[Mack *et al.*, 2006b]

Es wurde erstmals aus dem biofilmpositiven Stamm *S. epidermidis* 1457 isoliert [Mack *et al.*, 1992] und lässt sich mittels Ionenaustauschromatographie in zwei Polysaccharidfraktionen auftrennen, die als PIA I und PIA II bezeichnet werden. PIA I repräsentiert 80 % der Gesamtmenge. Durchschnittlich sind 15 bis 20 % der Zuckerreste nicht acetyliert und somit positiv geladen. PIA II ist strukturell mit PIA I verwandt, jedoch sind in PIA II im Durchschnitt mehr Glucosamin-Reste N-acetyliert. Zudem enthält es Phosphat und Ester-gebundenes Succinat, was den leicht anionischen Charakter von PIA II erklärt [Mack *et al.*, 1996a]. In einer Population von 179 klinischen *S. epidermidis* Isolaten konnte eine lineare Korrelation zwischen PIA-Produktion und Biofilmbildung und somit die essentielle Bedeu-

tung von PIA für die Biofilmmakkumulation gezeigt werden [Mack *et al.*, 1996b]. Die Bedeutung von PIA im Kontext Fremdkörper-assoziiierter Infektionen konnte in Tiermodellen belegt werden. In einem Rattenmodell wurde beispielsweise gezeigt, dass der biofilmpositive, PIA-exprimierende Wildtypstamm *S. epidermidis* 1457 signifikant häufiger Katheter-assoziierte Infektionen induziert als die PIA- und biofilmnegative Transposonmutante 1457-M10 [Rupp *et al.*, 1999b].

Der für die PIA-Synthese verantwortliche Genort wurde 1996 von Heilmann *et al.* identifiziert. Es handelt sich um das *ica* (*intercellular adhesion*) Operon, das sich aus den vier in gleicher Transkriptionsrichtung organisierten Genen *icaA*, *icaD*, *icaB* und *icaC* zusammensetzt [Gerke *et al.*, 1998; Heilmann *et al.*, 1996] (Abb. 3 B). Dem Operon vorgelagert ist das als Repressor fungierende Gen *icaR* [Conlon *et al.*, 2002]. IcaA trägt die Funktion einer N-Acetylglucosaminyl-Transferase, welche UDP-N-Acetylglucosamin als Substrat verwendet. IcaD könnte als Chaperon agieren und so für die korrekte Faltung von IcaA verantwortlich sein [Götz, 2002]. Nur in Anwesenheit von IcaD entfaltet IcaA seine volle enzymatische Aktivität [Gerke *et al.*, 1998]. Außerdem könnte IcaD als Bindeglied zwischen IcaA und IcaC dienen [Götz, 2002]. IcaB ist als Deacetylase für die Deacetylierung des fertigen PIA-Moleküls verantwortlich [Vuong *et al.*, 2004a]. *IcaC* kodiert für ein hydrophobes integrales Membranprotein, das möglicherweise sowohl am Export als auch an der Elongation des wachsenden Polysaccharids beteiligt ist. Erst die Koexpression der Proteine IcaA, IcaD und IcaC führt zur Synthese von Oligomeren mit ausreichender Kettenlänge, um diese mit einem PIA-spezifischen Antikörper reagieren zu lassen [Gerke *et al.*, 1998]. Sowohl in einem *in vivo* Rattenmodell für subkutane Katheter als auch in einem *Tissue-cage* Infektionsmodell konnte demonstriert werden, dass *icaADBC* Expression und PIA-Synthese für die Pathogenese Fremdkörper-assoziiierter Infektionen bei *S. epidermidis* von Bedeutung sind [Rupp *et al.*, 1999b; Vandecasteele *et al.*, 2003b; Fluckiger *et al.*, 2005].

Der *icaADBC*-Lokus wurde später auch in *S. aureus* [McKenney *et al.*, 1999; Cramton *et al.*, 1999] und *S. caprae* [Allignet *et al.*, 2001] identifiziert. *IcaADBC* homologe DNA-Sequenzen fanden sich zudem in einer Vielzahl weiterer Koagulase-negativer Staphylokokken wie *S. capitis*, *S. lugdunensis*, *S. auricularis*, *S. saprophyticus*, *S. intermedius*, *S. piscifermentans*, *S. simulans*, *S. condimenti*, *S. cohnii*, *S. lentus*, *S. caseolyticus* und *S. schleiferi* [Moretro *et al.*, 2003; Cramton *et al.*, 1999].

Da der *icaADBC*-Lokus in klinischen *S. aureus* Isolaten weitverbreitet ist [Götz, 2002] und signifikant häufiger in invasiven Stämmen zu finden war [Peacock *et al.*, 2002], scheint er eine wichtige Rolle im Kontext Fremdkörper-assoziiierter *S. aureus* Infektionen zu spielen.

Untersuchungen von *S.aureus icaADBC* Knock-out Mutanten in Tiermodellen lieferten allerdings keine überzeugenden Resultate. Nur eine Studie war in der Lage, eine signifikante Virulenzreduktion der *icaADBC* Mutanten zu demonstrieren, während drei weitere keine Assoziation zwischen einer *icaADBC* Deletion und einer konsekutiven Änderung der Virulenz aufzeigen konnten [Götz, 2004]. Diese Beobachtung ist möglicherweise auf die Präsenz alternativer, PIA-unabhängiger Mechanismen der Biofilm-Akkumulation zurückzuführen.

Ein Kandidat für den funktionellen PIA-Ersatz in der Biofilmbildung bei *S.aureus* ist das Biofilm-assoziierte Protein Bap (*biofilm associated protein*) [Lasa and Penades, 2006]. Bap gehört zu einer Gruppe von Oberflächenproteinen, die sowohl in grampositiven als auch in gramnegativen Bakterien zu finden sind und sich mehrere funktionelle und strukturelle Eigenschaften teilen [Lasa and Penades, 2006]. Primär wurde Bap in *S. aureus* Isolaten aus Mastitiden als ein zellwandgebundenes Protein identifiziert, das möglicherweise Biofilmbildung auf eine vollständig Polysaccharid-unabhängige Art und Weise induziert [Lasa and Penades, 2006].

In *S. epidermidis* wurden zwei Bap homologe Proteine identifiziert, Bap (*biofilm associated protein*) und Bhp (*Bap homologue protein*) [Lasa and Penades, 2006]. Diese Proteine waren allerdings nur in einer Minderheit klinisch signifikanter *S. epidermidis* Stämme zu finden [Rohde *et al.*, 2004] und scheinen demnach keine bedeutende Rolle in der Biofilmbildung von *S. epidermidis* einzunehmen. Da man in der klinischen Diagnostik dennoch regelmäßig *icaADBC*-negativen *S. epidermidis* Isolaten begegnet, sind *icaADBC*- und PIA-unabhängige Mechanismen der Biofilmbildung offensichtlich auch bei dieser Spezies von großer Bedeutung [Frank *et al.*, 2004; Rohde *et al.*, 2007].

Mittels Mitomycin Mutagenese des Stammes *S. epidermidis* RP62A konnte das 140 kDa große Aap (*Accumulation associated protein*) identifiziert werden [Hussain *et al.*, 1997]. Aap ist über ein LPXTG-Motiv in der Zellwand verankert und besteht aus einer Domäne A und einer repetitiven Domäne B [Rohde *et al.*, 2005] (Abb. 4).

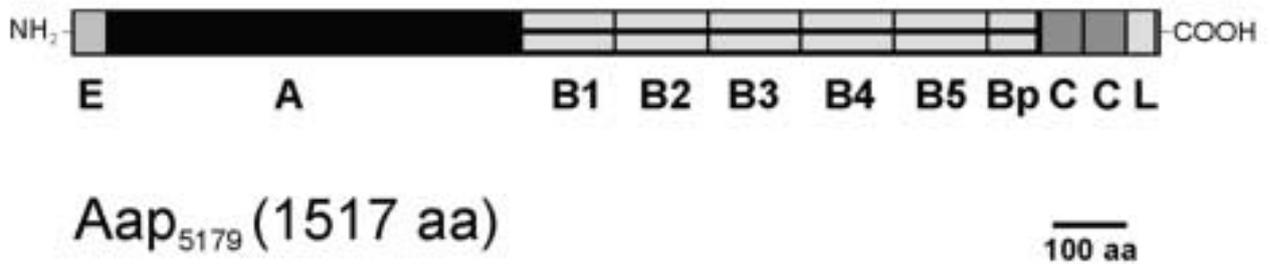


Abb. 4 Schematische Darstellung des *Accumulation associated protein* (Aap) von *S. epidermidis* 5179. Aap ist aus den beiden Domänen A und B zusammengesetzt. Während Domäne A keine signifikanten Homologien mit anderen Proteinen teilt, besteht Domäne B aus jeweils 128 Aminosäuren großen Wiederholungen. Diese Wiederholungen werden ferner als G5 Domänen bezeichnet [Bateman *et al.*, 2005] und finden sich auch in anderen bakteriellen Oberflächenproteinen. Die G5 Domäne besitzt eine hypothetische Bindungsaktivität für N-Acetylglucosamin. Der Aap Längenpolymorphismus resultiert aus einer differentiellen Anzahl an G5 Wiederholungen [Rohde *et al.*, 2004]. Bei dem biofilmpositiven *S. epidermidis* 5179-R1 ist Aap via Proteolyse gekappt und sein N-Terminus entspricht der Aminosäure 596 des vollständigen Aap-Moleküls, das vom biofilmmnegativen *S. epidermidis* 5179 produziert wird [Rohde *et al.*, 2005]. Erst nach dem proteolytischen Verlust von Domäne A erlangt Domäne B die Funktion als interzelluläres Adhäsion. E: Exportsignal, Bp: partielle Wiederholung, C: Collagen Trippel-Helix Motiv, L: LPXTG-Motiv. [Mack *et al.*, 2006b]

Durch die Anwendung einer Kombination aus differentiellen monoklonalen Anti-Aap Antikörpern konnte die Biofilm-Akkumulation des PIA-positiven *S. epidermidis* RP62A signifikant reduziert werden [Sun *et al.*, 2005]. Es wurde vermutet, Aap würde als PIA-Rezeptor fungieren und so die bakteriellen Zellen stabil in die extrazelluläre Matrix integrieren [Mack, 1999; Hussain *et al.*, 1997]. Diese Hypothese wurde durch das Ergebnis einer bioinformatischen Analyse gestützt, bei welcher N-Acetylglucosamin bindende G5 Domänen in der repetitiven Domäne B detektiert werden konnten [Bateman *et al.*, 2005]. Rohde *et al.* konnten jedoch zeigen, dass Aap in der Lage ist, absolut PIA-unabhängig Biofilm-Akkumulation zu vermitteln. Die interzellulären Adhäsionseigenschaften von Aap sind in der C-terminalen Domäne B lokalisiert. Interessanterweise wird diese Domäne erst nach der proteolytischen Abspaltung der Domäne A funktionell aktiv [Rohde *et al.*, 2005]. Infolgedessen können sowohl Exoproteasen der Staphylokokken als auch wirtseigene Proteasen im Rahmen der frühen Immunantwort gegen eine *S. epidermidis* Infektion direkt die Aap-Aktivierung initiieren und dadurch die Zellaggregation und Biofilmbildung induzieren. Auf diese Weise verhilft das wirtseigene Immunsystem dem Bakterium dazu, sich der Elimination durch Phagozytose zu entziehen [Foster, 2005]. Aap ist in klinisch signifikanten Isolaten weit verbreitet [Rohde *et al.*, 2004; Vandecasteele *et al.*, 2003a] und eine Aap abhängige Biofilmbildung konnte bei klinischen Isolaten direkt demonstriert werden [Rohde *et al.*, 2005]. Daher erscheint es möglich, dass Aap vermittelte interzelluläre Adhäsion als wichtiger Pathogenitätsfaktor in der Genese Fremdkörper-assoziiertes *S. epidermidis* Infektionen fungiert. Darüber hinaus teilt Aap signifikante Sequenzhomologien mit dem Zellwandprotein SasG (*Staphylococcus aureus*

surface protein) von *S. aureus*. Tatsächlich konnte kürzlich gezeigt werden, dass SasG tatsächlich, in Analogie zu Aap bei *S. epidermidis*, PIA-unabhängig Biofilmbildung vermitteln kann [Roche *et al.*, 2003b; Roche *et al.*, 2003a; Rohde *et al.*, 2005; Corrigan *et al.*, 2007].

2 Zielsetzung der Arbeit

Biofilmbildung ist der herausragende Pathomechanismus bei durch *S. aureus* und *S. epidermidis* verursachten Fremdmaterial-assoziierten Infektionen. Obwohl eine Vielzahl funktionell beteiligter Faktoren bei beiden Spezies bekannt ist, bleibt die relative Bedeutung der Fähigkeit zur Biofilmbildung sowie spezifischer genetischer Determinanten in definierten klinischen Situationen unklar. Die Kenntnis solcher Infektions-spezifischen Eigenschaften bei klinisch signifikanten *S. aureus* und *S. epidermidis* Stämmen ist jedoch unabdingbare Voraussetzung für die rationale Entwicklung von Strategien zur Impfstoffentwicklung und Verbesserung diagnostischer Möglichkeiten. Die Ziele dieser Arbeit können damit folgendermaßen formuliert werden.

1. Ein häufiges Problem epidemiologischer Untersuchungen ist die unklare klinische Signifikanz der untersuchten Bakterienstämme. Daher sollte hier durch Anwendung rigoroser mikrobiologischer Kriterien eine Stammsammlung aufgebaut werden, die ausschließlich klinisch signifikante, genetisch unabhängige, invasive Staphylokokken-Isolate aus periprotetischen Infektionen nach TKE und THE enthält.
2. Phänotypische Charakterisierung der Staphylokokken-Isolate hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung.
3. Erhebung der Prävalenz Virulenz-assoziiierter Gene.
4. Darstellung der differentiellen Bedeutung Protein- und Polysaccharid-abhängiger Biofilme der *S. aureus* und *S. epidermidis* Isolate sowie spezifische Darstellung Aap-abhängiger Biofilmbildung.

3 Material

3.1 Chemikalien und Einwegartikel

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma (Taufkirchen, Deutschland) in pro analysi-Qualität bezogen. Plastikartikel und Einwegmaterial stammte, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Becton Dickinson (Cockeysville, MD, USA), Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und Greiner (Nürtingen, Deutschland).

3.1.1 Laborgeräte

Tab. 5 Übersicht über verwendete Laborgeräte

| | Gerätebezeichnung | Hersteller |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Digital pH-Meter | Digital-pH-Meter 646 | Knick (Berlin) |
| Gel-Dokumentationssysteme | ChemiDoc™ XRS UV-Transilluminator | BioRad (Hercules, USA) Phase (Lübeck) |
| Gelelektrophoresekammern | | Keutz (Reiskirchen) |
| Photometer | DU® 530 Smart Spec™ 3000 GeneQuant ELISA Processor II | Beckman (Fullerton, USA) BioRad (Hercules, USA) Pharmacia Behring (Marburg) |
| Schüttelinkubator | | New Brunswick Scientific Co (New Brunswick, USA) |
| Spannungsquelle | Power Pac 1000 | BioRad (Hercules, USA) |
| Sterilfilter 0,22 µm | Spritzenvorsatzfilter | Merck (Darmstadt) |
| Thermocycler | Primus 96 plus Mastercycler gradient icycler IQ™ | MWG (Eberswalde) Eppendorf (Hamburg) BioRad (Hercules, USA) |
| Thermoinkubator | Blockthermostat BT 100 | Kleinfeld |

| | | |
|-----------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Ultraschallzerkleinerer | Digital Sonifier [®] | Branson (Danbury, USA) |
| Waagen | PC 4400 Sartorius 2432 | Mettler (Giessen, Schweiz) Sartorius (Göttingen) |
| Polyvinyl-Difluorid-Membran | | Millipore |
| 96-Loch Zellkulturschalen | Nunclon Δ | Nunc (Roskilde, Dänemark) |
| Zellkulturschalen | | Nunc (Roskilde, Dänemark) |
| Cell-Scraper | | Nunc (Roskilde, Dänemark) |
| Zentrifugen | Biofuge pico Biofuge 28 RS Megafuge 1.0 R | Heraeus (Osterode) Heraeus Heraeus |

3.1.2 Medien

Alle Medien wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit entionisiertem Wasser angesetzt und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert.

Columbia Blutagar (pH 7,0)

Columbia-Agar (Difco) 42,0

Bacto[®]-Agar (Difco) 1,0 g/l

Glucose 2,2 g/l

Schafsblut 72 ml/l

Hirn-Herz-Medium (*Brain Heart Infusion*, BHI); pH 7,4

BHI-Brühe pH 7,4 ± 0,2 (Difco) 37 g/l

Luria Bertani-Medium (LB); pH 7,0

Trypton (Oxoid) 10 g/l

Hefeextrakt (Difco) 5 g/l

NaCl 10 g/l

Für Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Bacto[®]-Agar (Difco) zugesetzt.

Peptone Yeast-Medium (PY; pH 7,5)

Pepton (Difco) 10g/l

Hefeextrakt (Difco) 5g/l

NaCl 5 g/l

Glucose 1 g/l

***Trypticase Soya Broth* (TSB)**

TSB_{BBL} pH 7,3 ± 0,5 (Becton Dickinson, Cockseyville, MD, USA) 30 g/l

TSB ohne Glucose (TSBØ; pH 7,3)

Trypton (Oxoid) 17 g/l

Neutralized Soya Peptone (Oxoid) 3,0 g/l

NaCl 5,0 g/l

K₂HPO₄ 2,5 g/l

3.2 Lösungen

Alle verwendeten Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit entionisiertem Wasser angesetzt und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert.

DNA-Ladepuffer

Bromphenolblau 0,25 %

Xylen Cyanol FF 0,25 %

Ficoll 15 %

Ethidiumbromid-Stammlösung

Es wurde eine Ethidiumbromidlösung mit 10 mg / ml in dH₂O angesetzt und ohne Sterilisation verwendet.

PBST-Puffer

Phosphatgepufferte Salzlösung versetzt mit Tween[®] 20 (0,1% [v/v])

Die Lösung wurde ohne Sterilisation verwendet.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; pH 7,4)

NaCl 8 g/l

KCl 0,20 g/l

Na₂HPO₄ 1,44 g/l

KH₂PO₄ 0,24 g/l

5x TBE

Tris (Invitrogen) 54 g/l

Borsäure 27,5 g/l

EDTA 0,5 M (pH 8,0) 20 ml/l

TE (pH 7,4)

Tris (Invitrogen) 10 mM

EDTA 1 mM

Tris-HCl

1,5 M Tris (Invitrogen) wurde mit 1 M HCl auf pH 8,8 eingestellt.

1 M Tris (Invitrogen) wurde mit 1 M HCl auf pH 6,8 eingestellt.

3.3 Antiseren

Für den Nachweis von PIA wurde ein polyklonales Kaninchenantiserum, welches durch Immunisierung mit gereinigtem PIA gewonnen wurde, verwendet [Mack *et al.*, 1994a]. Für Biofilminhibitionsstudien kam ein gegen rekombinante Aap Domäne-B generiertes, polyklonales Kaninchenantiserum zur Anwendung [Rohde *et al.*, 2007].

3.4 Bakterienstämme

Tab. 6 Übersicht der verwendeten Bakterienstämme und deren Charakteristika

| Stamm | Charakteristika | Referenz |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <i>S. epidermidis</i> 1457 | Blutkultur-Isolat, biofilmpositiv, <i>ica</i> -positiv | [Mack <i>et al.</i> , 1992] |
| <i>S. epidermidis</i> 1457-M10 | <i>icaA</i> ::Tn917, biofilmnegativ | [Mack <i>et al.</i> , 1994] |
| <i>S. epidermidis</i> RP62A | ATCC 35984, biofilmpositiv, <i>ica</i> -positiv | [Schumacher-Perdreau <i>et al.</i> , 1994] |
| <i>S. epidermidis</i> BK9225 | Blutkultur-Isolat, biofilmnegativ, <i>ica</i> -negativ | [Mack <i>et al.</i> , 1992] |
| <i>S. epidermidis</i> 5179-R1 | Biofilmpositive Subpopulation des Stamms BK5179, Aap-abhängige Biofilmbildung, <i>icaA</i> ::IS257 | [Rohde <i>et al.</i> , 2005] |

3.5 Oligonukleotide

Tab. 7 Übersicht der verwendeten Primer

| Gene | Vermeintliche Funktion der kodierten Proteine | Referenz | Primer | PCR-Bedingungen (Ref.) |
|------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| <i>S. aureus</i> | | | | |
| <i>fnbA</i> | Fibronektin Adhäsion Fibrinogen Adhäsion | [Mack <i>et al.</i> , 2000] | forward 5' -CAC AAC CAG CAA ATA TAG-3' reverse 5' -CTG TGT GGT AAT CAA TGTC-3' | [Peacock <i>et al.</i> , 2002] |
| <i>clfA</i> | Fibrinogen Adhäsion | [Mack <i>et al.</i> , 2000] | forward 5' -GTA GGT ACG TTA AAT CGG TT-3' reverse 5' -CTC ATC AGG TTG TTC AGG-3' | [Peacock <i>et al.</i> , 2002] |
| <i>clfB</i> | Fibrinogen Adhäsion | | forward 5' -TGC AAG ATC AAA CTG TTC CT-3' reverse 5' -TCG GTC TGT AAA TAA AGG TA-3' | [Peacock <i>et al.</i> , 2002] |
| <i>cna</i> | Collagen Adhäsion | [Mack <i>et al.</i> , 2000] | forward 5' -AGT GGT TAC TAA TAC TG-3' reverse 5' -CAG GAT AGA TTG GTT TA-3' | [Peacock <i>et al.</i> , 2002] |
| <i>spa</i> | Bindet Immunglobulin und von Willebrand Faktor | [Mack <i>et al.</i> , 2000] | forward 5' -TCG AAA TAG CGT GAT TTT GC-3' reverse 5' -GCA CTG AGC AAC AAA AGA TG-3' | [Peacock <i>et al.</i> , 2002] |
| <i>bbp</i> | Bindet <i>Bone Sialoprotein</i> | [Tung <i>et al.</i> , 2000] | forward 5' -CAG TAA ATG TGT CAA AAG A-3' reverse 5' -ACTTTG TCA TCA ACT GTA AT-3' | [Peacock <i>et al.</i> , 2002] |
| <i>sdrC</i> | Vermeintliches Adhäsion mit unbekanntem Liganden | [Josefsson <i>et al.</i> , 1998] | forward 5' -ACG ACT ATT AAA CCA AGA AC-3' reverse 5' -GTA CTT GAA ATA AGC GGT TG-3' | [Peacock <i>et al.</i> , 2002] |
| <i>sdrD</i> | Vermeintliches Adhäsion mit unbekanntem Liganden | [Josefsson <i>et al.</i> , 1998] | forward 5' -GGA AAT AAA GTT GAA GTT TC-3' reverse 5' -ACT TTG TCA TCA ACT GTA AT-3' | [Peacock <i>et al.</i> , 2002] |

| | | | | |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>sdrE</i> | Homolog mit <i>bbp</i> ; vermeintliches <i>Bone Sialoprotein</i> bindendes Protein | [Josefsson <i>et al.</i> , 1998; Tung <i>et al.</i> , 2000] | forward 5' -CAG TAA ATG TGT CAA AAGA-3' reverse 5' -TTG ACT ACC AGC TAT ATC-3' | [Peacock <i>et al.</i> , 2002] |
| <i>ebpS</i> | Elastin Adhäsion | [Mack <i>et al.</i> , 2000; Downer <i>et al.</i> , 2002] | forward 5' -CAA TCG ATA GAC ACA AAT TC-3' reverse 5' -CAG TTA CAT CAT CAT GTT TA-3' | [Peacock <i>et al.</i> , 2002] |
| <i>map / eap</i> | Bindung von extrazellulären Matrixproteinen; fördert die ICAM-1-Adhäsion | [Mack <i>et al.</i> , 2000; Chavakis <i>et al.</i> , 2002] | forward 5' -TAA CAT TTA ATA AGA ATC AA-3' reverse 5' -CCA TTT ACT GCA ATT GT-3' | [Peacock <i>et al.</i> , 2002] |
| <i>sasG</i> | Adhärenz an desquamierten nasalen Epithelzellen | [Roche <i>et al.</i> , 2003b] | forward 5' -CGC GGA TTC GCA GCT GAA AAC AAT ATT -3' reverse 5' -CCC AAG CTT TAA TTC TGT TAT TGT TTT TGG -3' | 5 min, 94°C; (30 sec, 94°C; 20 sec, 60°C; 50 sec, 72°C) x 30; finale Extension 4 min 72°C |
| <i>icaA</i> | N-Acetylglucosaminyltransferase, involviert in die PIA Synthese | [Cramton <i>et al.</i> , 1999] | forward 5' -TGG CTG TAT TAA GCG AAG TC -3' reverse 5' -CCT CTG TCT GGG CTT GAC C-3' | [Rohde <i>et al.</i> , 2001a] |
| <i>bap</i> | Beteiligt bei der Biofilmbildung in <i>S. aureus</i> Isolaten von boviner Mastitis | [Cucarella <i>et al.</i> , 2001] | forward 5' -CCC TAT ATC GAA GGT GTA GAA TTG CAC-3' reverse 5' -GCT GTT GAA GTT AAT ACT GTA CCT GC-3' | [Cucarella <i>et al.</i> , 2001] |
| <i>S. epidermidis</i>, KNS | | | | |
| <i>fbe</i> | Fibrinogen Adhäsion | [Mack <i>et al.</i> , 2006b] | forward 5' -CTA CAA GTT CAG GTC AAG GAC AAG G-3' reverse 5' -GCG TCG GCG TAT ATC CTT CAG-3' | [Rohde <i>et al.</i> , 2004] |
| <i>embp</i> | Fibronectin Adhäsion | [Mack <i>et al.</i> , 2006b] | forward 5' -AGC GGT ACA AAT GTC AAT-3' reverse 5' -AGA AGT GCT CTAG CAT CAT CC-3' | [Williams <i>et al.</i> , 2002] |

| | | | | |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| <i>atlE</i> | Fördert die Bindung an Polystyrol; Vitronectin Adhäsion | [Mack <i>et al.</i> , 2006b] | forward 5'-CAA CTG CTC AAC CGA GAA CA-3' reverse 5'-TTT GTA GAT GTT GTG CCC CA-3' | [Rohde <i>et al.</i> , 2004] |
| <i>aap</i> | Interzelluläres Adhäsion | [Rohde <i>et al.</i> , 2005] | forward 5'-GAA ATG ACT GAA CGT CCG AT-3' reverse 5'-GCG ATC AAT GTT ACC GTA GT-3' | [Rohde <i>et al.</i> , 2004] |
| <i>icaA</i> | N-Acetylglucosaminyltransferase, involviert in die PIA Synthese | [Mack <i>et al.</i> , 2006b] | forward 5'- CTG TTT CAT GGA AAC TCC -3' reverse 5'- TCG ATG CGA TTT GTT CAA ACA T -3' | [Rohde <i>et al.</i> , 2004] |
| <i>Bhp</i> | Homolog zum Biofilm-assoziierten Protein Bap von <i>S. aureus</i> | [Mack <i>et al.</i> , 2006b] | forward 5'-ATG GTA TTA GCA AGC TCT CAG CTG G-3' reverse 5'-AGG GTT TCC ATC TGG ATC CG-3' | [Rohde <i>et al.</i> , 2004] |
| <i>IS257</i> | Mobiles genetisches Element, gefunden in klinischen und kommensalen Stämmen. | [Rohde <i>et al.</i> , 2001b;Rohde <i>et al.</i> , 2004] | forward 5'-ACG TTC ATC ATT CAA CGG TC-3' reverse 5'-AGT GTT CGC TTA ACT TGC TAG-3' | [Rohde <i>et al.</i> , 2004] |
| <i>IS256</i> | Mobiles genetisches Element, involviert in die genomische Plastizität. | [Ziebuhr <i>et al.</i> , 1999] | forward 5'-TGA AAA GCG AAG AGA TTC AAA GC-3' reverse 5'-ATG TAG GTC CAT AAG AAC GGC-3' | [Ziebuhr <i>et al.</i> , 1999] |
| <i>mecA</i> | Kodiert PBP2A, vermittelt Methicillin-Resistenz | [Horstkotte <i>et al.</i> , 2002] | forward 5'-GAA ATG ACT GAA CGT CCG AT-3' reverse 5'-GCG ATC AAT GTT ACC GTA GT-3' | [Rohde <i>et al.</i> , 2004] |

3.6 Bakterienstammsammlung

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme wurden in der Zeit von 2001 – 2003 in der ENDO-Klinik Hamburg bei Patienten mit Infektionen nach Hüft- oder Knieendoprothesenimplantationen isoliert. Alle Patienten präsentierten sich mit den klinischen Symptomen einer Protheseninfektion (Schmerzen, Fieber, lokale Überwärmung, Sekretion aus Fisteln; N. Siemssen, ENDO-Klinik Hamburg). Die primäre Implantation bei den Patienten wurde in der Regel extern vorgenommen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Infektionen nicht in einem endemischen Hintergrund erworben wurden. Zur mikrobiologischen Diagnostik wurde zum einen präoperativ ein Punktat des betroffenen Gelenks, zum anderen ein intraoperativ gewonnener Abstrich unter Anwendung gängiger mikrobiologischer Verfahren untersucht (L. Frommelt, ENDO-Klinik Hamburg). Die angezüchteten Stämme wurden biochemisch unter Verwendung des ID32Staph-Systems (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Frankreich) nach Angaben des Herstellers auf Speziesebene identifiziert. Eine Übersicht der untersuchten Bakterienstämme findet sich im Anhang (Abschnitt 9.1.)

3.7 Datenbanken und Programme

Die im Rahmen der *aap*-Repeat-Analyse entstandenen Agarosegele sind mit dem GelPro Analyzer (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) ausgewertet worden.

4 Methoden

4.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung von Bakterien

Alle verwendeten Bakterienstämme wurden in der Regel in Flüssigmedien bei 37°C kultiviert. Vorkulturen wurden entweder für sechs Stunden oder über Nacht inkubiert und anschließend für die Hauptkultur im gewünschten Medium verdünnt. Je nach Versuchsreihe wurden die Vorkulturen 1:20 oder 1:100 verdünnt. Schüttelkulturen wurden bei 160-200 rpm in sterilen Glasgefäßen inkubiert.

Für eine Stammhaltung wurden die Bakterien auf Blutagarplatten ausgestrichen, 24 h bei 37°C bebrütet, anschließend bei 4°C gelagert und in regelmäßigen Abständen subkultiviert. Gegebenenfalls wurden den Agarmedien Antibiotika zur Selektion zugesetzt.

Mittels der Mast Diagnostica Cryobank wurden die Bakterienstämme bei -80°C archiviert.

4.1.2 Biotypisierung

Zur eindeutigen Identifikation der Bakterienstämme wurde eine Biotypisierung mit dem ID 32 STAPH (API Systems, bioMérieux) der gesamten Stammsammlung durchgeführt. Die Typisierung beruht auf einer durch Farbumschlag detektierten Verstoffwechslung von Substraten. Das Vorgehen erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

4.1.3 Biofilmtestung [Mack *et al.*, 2001]

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung von Staphylokokken-Stämmen wurde anhand eines semi-quantitativen Biofilmtests ermittelt [Christensen *et al.*, 1985]. Der biofilmpositive *S. epidermidis* 1457 diente dabei als Positivkontrolle und als Negativkontrolle die biofilmnegative Tranposonmutante 1457-M10.

Ein bis zwei Kolonien des zu untersuchenden Stammes wurden in 2 ml Medium suspendiert und als Schüttelkultur für 5-6 Stunden bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Als Medien dienten TSB_{BBL} und BHI, die je nach Staphylokokken-Spezies mit NaCl, Glukose oder Glukose + Saccharose supplementiert wurden. Die vorkultivierten Stämme wurden 1:100 im gleichen Medium verdünnt und hiervon je viermal 200 µl in die Näpfe einer Mikrotiterplatte (Nunc- Δ , Nunc) pipettiert. Nach 20-24-stündigem Wachstum bei 37°C wurde das Medium abgegossen und die Platte mit Hilfe einer Multichannelpipette viermal mit 200 µl PBS pro Napf gewaschen. Dabei war zu beachten, den Spühlstrahl nicht senkrecht auf den Boden der Näpfe zu richten, da es sonst zu einer mechanischen Destruktion des Biofilms kommen könnte. Anschließend wurde die Platte für 12 Stunden an der Luft getrocknet (alternativ für 6 Stunden bei 37 °C) und die adhärierenden Bakterien mit 150 µl Kristallviolett pro Napf für 5 min gefärbt. Die Färbelösung wurde in einem 45° Winkel unter fließendem Wasser vorsichtig ausgespült und nach erneutem Trocknen (siehe oben) photometrisch ausgewertet. Dazu wurde die Absorption im ELISA Processor II (Behring) bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm bestimmt. Durch Berechnung des Mittelwertes aus 2 mal 4 Einzelwerten wurde der Biofilmphänotyp beurteilt. Hierbei galt eine Absorption von A_{570} 0,1 als *cut-off* zur Unterscheidung eines biofilmpositiven und biofilmmnegativen Phänotyps. Eine Absorption $\geq 1,0$ wurde als starke Biofilmproduktion definiert.

4.1.4 Testung der Biofilmstabilität gegenüber Trypsin und DspB [Rohde *et al.*, 2005]

Um die Stabilität der etablierten Biofilme gegenüber Proteasen und Dispersin B (DspB) von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* zu testen, wurden die Zellen über Nacht in Zellkultur-Mikrotiterplatten (Nunc- Δ , Nunc) kultiviert. Es wurde jeweils das geeignete Wachstumsmedium, wie oben beschrieben, verwendet. Daraufhin wurde das Medium mittels Pipette entfernt und ein neues, supplementiert mit Trypsin (100 µg/ml) oder DspB (10 µg/ml), hinzugefügt. Die Mikrotiterplatten wurden nun für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das Medium ohne das jeweilige Enzym diente als Negativkontrolle. *S. epidermidis* 1457 (PIA-abhängige Biofilmbildung) und 5179-R1 (Aap-abhängige Biofilmbildung) fungierten als Positivkontrollen für DspB- beziehungsweise Trypsin-sensitive Biofilme.

Die Präsenz von DspB und Trypsin hatte auf die Wachstumskinetik von vier zufällig ausgewählten *S. epidermidis* und *S. aureus* Stämmen keinen Einfluss (Daten nicht gezeigt).

4.1.5 Inhibition der Biofilmbildung bei *S. epidermidis* durch anti-Aap Domäne-B Antiserum

Die Generierung des anti-Aap Domäne B Antiserums erfolgte wie beschrieben [Rohde *et al.*, 2005]. Um das Antiserum auf die Präsenz von spezifischen Antikörpern zu testen, wurde ein ELISA durchgeführt. Während das präimmunisierte Serum keine anti-Aap Domäne B Antikörper enthielt, wurde in dem postimmunisierten Serum ein anti-Aap Domäne B Antikörper-Titer von 1:32.000 detektiert. Die Inhibierung der Biofilmproduktion wurde unter Verwendung verschiedener Verdünnungsstufen beider Seren wie beschrieben [Rohde *et al.*, 2005] durchgeführt. *S. epidermidis* 5179-R1 diente dabei als Positivkontrolle, *S. epidermidis* 1457 als Negativkontrolle.

4.1.6 Semiquantitativer Koagglutinationstest zum Nachweis von PIA [Mack *et al.*, 2001]

4.1.6.1 *Staphylococcus aureus* Cowan I-Präparation

Die Zellen einer Übernachtskultur in 800 ml TSB_{BBL} wurden durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 6000 rpm geerntet und zweimal in 100 ml PBS + 0,05 % NaN₃ gewaschen. Nach Bestimmung des Bakteriengewichtes wurden die Zellen in einer Konzentration von 10 % (wt/vol) in PBS + 0,05 % NaN₃ + 1,5 % (vol/vol) Formaldehyd aufgenommen und über 120 min unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur fixiert. Durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 6000 rpm wurden die Zellen pelletiert und in PBS + 0,05 % NaN₃ aufgenommen. Nach Inkubation für 5 min im 80°C heißen Wasserbad wurden die Zellen für einige Minuten auf Eis abgekühlt, um daraufhin erneut zweimal mit PBS + 0,05 % NaN₃ gewaschen zu werden. Nach erneuter Bestimmung des Gewichts der Zellen wurden diese final in einer Konzentration von 10 % (wt/vol) in PBS + 0,05 % NaN₃ aufgenommen. Verteilt in 1,5 ml Aliquots wurden die Zellen bei -80°C archiviert.

4.1.6.2 Herstellung des Koagglutinationsreagenz aus anti-PIA-Antikörpern und *Staphylococcus aureus* Cowan I

Ziel war es, die anti-PIA-Antikörper Protein A-vermittelt über ihr Fc-Fragment an der Oberfläche von *Staphylococcus aureus* Cowan I zu fixieren. Dazu wurde die aufgetaute Cowan I-Präparation dreimal in PBS + 0,05 % NaN₃ gewaschen und das resultierende Pellet in 1 ml PBS + 0,05 % NaN₃ resuspendiert. Nun wurden 100 µl des polyklonalen anti-PIA-

Antiserums hinzugegeben und gründlich mit der Bakteriensuspension gemischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen durch Zentrifugation (14000 rpm für 1 min) geerntet, zweimal mit 1 ml PBS + 0,05 % NaN₃ gewaschen, erneut durch Zentrifugation geerntet und in 1 ml PBS + 0,05 % NaN₃ aufgenommen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in 9 ml PBS + 0,05 % NaN₃ überführt und bei 4°C gelagert.

4.1.6.3 Durchführung des Koagglutinations-Assay

Drei bis vier Kolonien des zu untersuchenden Stammes wurden über Nacht bei 37°C und 120 rpm in 2 ml Medium angezchtet. Um eine maximale PIA-Produktion zu erzielen, wurde das Medium gewählt, das die stärkste Biofilmbildung induziert hatte. Die Vorkultur wurde 1:100 in 2 ml Medium verdünnt und für 24 Stunden bei 37°C und 120 rpm inkubiert. 5 µl der Hauptkultur wurden mit 15 µl des Koagglutinationsreagenz auf einen Glasobjektträger pipetiert. Durch zweiminütige kreisende Bewegungen wurden die Zellen homogen mit dem Koagglutinationsreagenz vermischt. Unter hellem Licht gegen einen dunklen Hintergrund konnte das Koagglutinationsergebnis abgelesen werden. Bei Präzipitation sichtbarer Agglutinate wurde von einer relevanten PIA-Synthese des untersuchten Stammes ausgegangen und dieser als PIA-positiv bezeichnet. Fehlte eine Koagglutination, wurde dies als Zeichen einer fehlenden PIA-Synthese gedeutet und der betreffende Stamm als PIA-negativ klassifiziert. Als Positivkontrolle wurde stets *S. epidermidis* 1457 und als Negativkontrollen *S. epidermidis* 1457-M10, PBS + 0,05 % NaN₃ und das jeweilige sterile Medium mitgeführt. Um eine semi-quantitative Aussage über die PIA-Synthese treffen zu können, wurde die Hauptkultur im jeweiligen Medium 1:10 und 1:100 verdünnt und hieran eine Koagglutination in der oben beschriebenen Weise angeschlossen. Erfolgte eine Koagglutination auch bei einer höheren Verdünnung, so wurde die synthetisierte PIA-Menge dieses Stammes im Vergleich zu Stämmen, bei denen dies nicht der Fall war, als größer betrachtet.

4.1.7 Nachweis von PIA durch Immuno-Dot-Blot [Mack *et al.*, 2001]

4.1.7.1 PIA-Präparation

Ziel war es, das Interzelluläre-Polysaccharid-Adhäsion (PIA) von der Oberfläche der Bakterienzellen zu lösen, um es so weiteren Experimenten zugänglich zu machen. Hierfür wurden die Bakterienstämme als Reinkultur auf Blutagarplatten kultiviert. Sieben bis acht Kolonien

eines Stammes wurden in 2 ml TSB_{BBL} suspendiert und als Schüttelkultur für 5 Stunden bei 37°C und 180 rpm angezchtet. Die Vorkultur wurde 1:100 in eine mit 5 ml TSB_{BBL} gefüllte Petri-Zellkulturschale verdünnt, durch manuelles Schwenken homogen verteilt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Bakterien in den Zellkulturschalen mobilisiert. Die resultierende Suspension wurde mit einer Glaspipette in ein steriles 10 ml Polystyrolröhrchen überführt und für 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden alle weiteren Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Das resultierende Pellet wurde in 5 ml PBS-Puffer resuspendiert und mit dem Digital Sonifier[®] (Branson (Danbury, USA)) einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Nun folgte eine erneute Zentrifugation für 15 min bei 5000 rpm mit anschließender Überführung des Überstandes in ein Eppendorf-Tube. Nach finaler Zentrifugation bei 4°C in einer Kühlzentrifuge für mindestens 45 min bei 14000 rpm wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Tube überführt und bei -20°C archiviert.

4.1.7.2 Immunoblot (Western-Blot)

Ziel war es, die in der PIA-Präparation resultierenden Proben auf die Anwesenheit des interzellulären Polysaccharid Adhäsins (PIA) zu untersuchen. Prinzip des Immunoblots ist es, mittels spezifischer Antikörper, die enzymgekoppelt sind, spezifische Antigene zu detektieren. Um eine Quantitative Aussage über die PIA-Produktion der Bakterienstämme machen zu können, wurde von den jeweiligen Proben eine geometrische Verdünnungsreihe von 1:8 bis 1:256 hergestellt. Daraufhin wurden die Proben punktförmig auf eine mit Methanol und PBS vorbehandelte PVDF-Membran (Polyvinyl-Difluorid) aufgetragen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran nach kurzer Trocknungszeit für eine Stunde in einer Milchpulversuspension (3 %, wt/vol) geblockt. Zum Nachweis des Interzellulären Polysaccharid-Adhäsins (PIA) wurde die Membran für 60 Minuten mit 1:800 verdünntem anti-PIA-Antiserum inkubiert. Nach dem Waschen der Membran (zweimal 15, einmal 5 Minuten mit TTSB) zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper konnten gebundene anti-Pia-Antikörper durch eine einstündige Inkubation mit 1:5000 verdünnten, biotinylierten anti-Kaninchen-Antikörpern dargestellt werden. Nach erneutem Waschen für zweimal 15 und einmal 5 Minuten wurden diese durch Inkubation mit Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Konjugat in einer Verdünnung von 1:1500 dargestellt. Nach erneutem Waschen wurde die Membran für 1 Minute mit dem ECL-Western-Blotting-Detection-Reagens inkubiert. Die Chemilumineszenz-Detektion der Antigen-Antikörperkomplexe erfolgte in der Dunkelkammer durch Auflegen eines Röntgenfilms.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die horizontale Gelelektrophorese wurde zur größenabhängigen Auftrennung von Plasmiden, von Fragmenten gespaltener Plasmide oder zum Nachweis von Amplikons aus der PCR eingesetzt [Sambrook *et al.*, 1989]. Je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente wurden 0,5 bis 2 %-ige [w/v] Agarosegele verwendet. Hochreine Agarose (SeaKem ME Agarose, Biozym) wurde in 100 ml 0,5 x TBE-Puffer aufgeköcht und mit 1,5 µl Ethidiumbromidkonzentrat supplementiert, das als Interkalator fungierte. Anschließend wurde das Gel unter Vermeidung von Luftblasen in einen Gelträger gegossen. Die Geltaschen wurden hierbei durch in das Gel gehängte Kämmen vorgegeben. Die Proben wurden mit 2 µl DNA-Ladepuffer versetzt und nach Entfernung des Kamms in die Taschen des Gels eingefüllt. Eine Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 3-6 V/cm in 0,5 x TBE als Laufpuffer. Als Größenstandard wurde ein Mix aus *Hind*III gespaltener λ-DNA und *Hae*III gespaltener φX174-DNA (Finnzymes, Espoo, Finnland) aufgetragen. Der Mix enthielt 19 Fragmente der folgenden Größen: 23kb, 9,4kb, 6,5kb, 4,3kb, 2,3kb, 2kb, 1,3kb, 1kb, 872bp, 603bp, 564bp, 310bp, 281bp, 271bp, 234bp, 194bp, 125bp, 118 bp, 72bp. Die Gele wurden auf einem Transilluminator mit einem angeschlossenen Bilddokumentationssystem (Phase, Lübeck) fotografiert.

4.2.2 Präparation chromosomaler Staphylokokken-DNA

Zur Vorbereitung wurden die Staphylokokken in PY-Medium + 1 % Glycin als Schüttelkultur über Nacht angezüchtet. Der Zusatz von Glycin im Überschuss erhöht dessen Anteil in den Pentapeptidvernetzungen des Peptidoglykans. Durch diesen Effekt wird eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber dem Glycin – Glycin Bindungen spaltenden Lysostaphin erzielt. Der Aufschluss der bakteriellen Zellwand wird dadurch deutlich effektiver. Bakterien einer 2 ml Übernachtschüttelkultur wurden durch Zentrifugation geerntet und in 180 µl EB-Puffer (Qiagen, Hilden) aufgenommen. Zu dieser Suspension wurden 10 µl Lysostaphin (1500U/ml) gegeben. Nach 30 minütiger Inkubation im Heizblock bei 37 °C wurden 180 µl ATL-Puffer (Qiagen, Hilden) zugegeben. Die weitere Präparation der chromosomalen DNA wurde nach dem Standard-Protokoll des QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Der Erfolg der DNA-Präparation wurde in einer 0,7 %igen Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Daraufhin wurde die DNA bei -20°C gelagert.

4.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ist eine Standardmethode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Doppelsträngige DNA dient dabei als Vorlage (Template). Zwei zu den Einzelsträngen komplementäre, gegenläufige Oligonukleotide, die sogenannten Primer, dienen der DNA-Polymerase als Starthilfe. Durch alternierende Zyklen von Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer und Synthese des komplementären Stranges erzielt man eine exponentielle Vervielfältigung des ursprünglichen Fragments.

Standardmäßig wurde die PCR mit Hilfe des DyNAzymeTM DNA Polymerase Kit (Finnzyme, Espoo, Finnland) in einem DNA Thermal Cycler (MWG) mit beheiztem Deckel durchgeführt. In einem 50 µl Ansatz wurden circa 100 ng Template-DNA, Primer in einer Konzentration von 15 pM/µl, dNTPs mit je 200 µM, 1 U Polymerase und der zugehörige Mg²⁺-haltige Puffer (1,5 mM) eingesetzt. In einigen Fällen wurde die Templatemenge sowie die Mg²⁺-Konzentration variiert. Initial wurde die DNA zwei Minuten bei 94°C denaturiert, in den anschließenden Zyklen jeweils nur für 15 s. Für die Anlagerung der Primer wurde die Temperatur für 30 s auf 55°C abgesenkt. Die Synthese des Zweitstranges erfolgte bei 72°C (Extensionsphase). Nach in der Regel 30 Zyklen schloss sich eine siebenminütige Synthesephase an, um eine vollständige Komplementierung aller Einzelstränge zu gewährleisten. In Abhängigkeit von den gewählten Primern wurden gegebenenfalls andere Bedingungen in der Anlagerungsphase gewählt. Am Ende eines Programms wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt. In einer Agarosegelelektrophorese fand die Kontrolle des PCR-Ergebnisses statt.

Für die *aap*-Repeat-Analyse oder zur Sequenzierung wurde das *Expand High Fidelity* PCR System (Roche, Indianapolis, USA) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Es enthält eine *proofreading* DNA-Polymerase mit inhärenter Exonukleaseaktivität, die auftretende Synthesefehler reparieren kann und so eine höhere Genauigkeit gewährleistet.

4.2.4 PFGE (Pulsfeldgelelektrophorese)

Mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese wurde die Klonalität der Bakterienstämme untersucht. Zwei zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnene Bakterienisolate galten als klonal identisch, wenn das Bandenmuster der Pulsfeldgelelektrophorese weniger als drei Bandendifferenzen zeigte. Durchgeführt wurden die Pulsfeldgelelektrophoresen unter Mithilfe von S. Scherpe (Institut für Medizinische Mikrobiologie, UK Hamburg-Eppendorf) mit dem CHEF-DR II (Bio-Rad, München, Deutschland), wobei ein Standardprotokoll zur Anwendung kam [Schwarzkopf *et al.*, 1993].

5 Ergebnisse

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, stellen nosokomiale Fremdkörperinfektionen durch Staphylokokken ein bedeutendes Problem in der modernen Medizin dar. Dies ist im Besonderen bedingt durch einerseits fehlende präventive, andererseits durch mangelnde diagnostische und therapeutische Möglichkeiten. Trotz der großen Fortschritte im Verständnis der molekularen Pathogenese fremdkörperassoziierter Infektionen ist nur sehr wenig über die relative Bedeutung einzelner Pathogenese-assoziiierter Virulenzfaktoren in bestimmten klinischen Situationen (zum Beispiel Fremdkörperinfektionen, Sepsis, Wundinfektionen) bekannt. Da die Biofilmbildung in der Pathogenese der Fremdkörperinfektion durch Staphylokokken eine herausragende Bedeutung hat, waren die Verteilung der für die Biofilmbildung essentiellen Gene sowie der Biofilmphänotyp bei Staphylokokkenisolaten aus Endoprothesen-assoziierten Infektionen in dieser Arbeit von besonderem Interesse. Des Weiteren sollten Kenntnisse darüber gesammelt werden, durch welche der bekannten interzellulären Adhäsionsmoleküle die akkumulative Phase der Biofilmbildung bei den hier untersuchten Stämmen vermittelt wird.

5.1 Etablierung einer Sammlung klinisch signifikanter Staphylokokken-Stämme aus Endoprotheseninfektionen

Grundlage dieser Arbeit war der Aufbau einer Sammlung definierter, klinisch signifikanter Isolate der Gattung *Staphylococcus*. Die Bakterienstämme wurden in der ENDO-Klinik Hamburg, einem Spezialzentrum für die Behandlung Fremdkörper-assoziiierter Knocheninfektionen, isoliert. Pro Patient wurden zwei Isolate (prä- und intraoperativ gewonnen; siehe Abschnitt 3.6) weiter analysiert. Ziel der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen war es nicht nur, eine generelle Beschreibung der Stammsammlung zu ermöglichen, sondern auch die Klonalität der von einem Patienten gewonnenen Isolate zu beweisen. Diese Erkenntnisse müssen als Grundvoraussetzung dafür gelten, eine mikrobiologisch fundierte Aussage über die klinische Relevanz der verschiedenen Stämme zu treffen.

5.1.1 Speziesidentifikation

Die hier untersuchten Stämme waren bereits präliminär unter Verwendung einfacher phänotypischer Testverfahren auf Speziesebene identifiziert. Um eine eindeutige Bestimmung durchzuführen, erfolgte eine zusätzliche Speziesidentifikation der Bakterienstämme durch Biotypisierung mittels des ID 32 STAPH Systems (API Systems, bioMérieux). Die Typisierung beruht auf einer durch Farbumschlag detektierten Verstoffwechselung von 26 verschiedenen Substraten und gilt als Goldstandard der Identifikation von Staphylokokken [Horstkotte *et al.*, 2004]. Infolge der Biotypisierung mussten 3 Stämme neu klassifiziert werden.

Die Ergebnisse der Biotypisierung der Stammsammlung führten zu der in Tab. 8 dargestellten Speziesverteilung. Von den insgesamt 54 Bakterienstämmen zählten 30 (56 %) zur Spezies *S. epidermidis* und 14 (26 %) zur Spezies *S. aureus*. Die übrigen 10 (18 %) Stämme wurden in der Gruppe KNS (Koagulase-negative Staphylokokken) zusammengefasst und umfassen 4 *S. capitis*, 3 *S. lugdunensis*, 1 *S. caprae*, 1 *S. haemolyticus* und 1 *S. warneri* Stamm. Sowohl die Zahl der *S. epidermidis* Isolate als auch die Zahl der *S. aureus* Isolate zeigte eine annähernd gleiche Verteilung bei periprothetischen Infektionen nach TKE (Totale Knie-Endoprothese) und THE (Totale Hüft-Endoprothese). Bei den *S. epidermidis* unabhängigen KNS wurden deutlich mehr Stämme bei Infektionen nach TKE isoliert (TKE 8 Stämme, THE 2 Stämme), was aufgrund der niedrigen Fallzahl allerdings als nicht signifikant zu werten ist.

In jedem Fall gehörten korrespondierende Isolate eines Patienten einer Spezies an. Diese Aussage liefert allerdings noch keinen sicheren mikrobiologischen Beweis, dass es sich bei den

Folgeisolaten auch um den gleichen Stamm handelt. Zur Klärung dieser Frage wurde eine Klonalitätsprüfung mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) angeschlossen.

Tab. 8 Übersicht über die Speziesverteilung der Stammsammlung (n=54)

| Spezies | Gesamt (n=54) | TKE ^a (n=25) | THE ^a (n=29) |
|-----------------------|---------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>S. epidermidis</i> | 30 (56 %) | 11 (44 %) | 19 (65 %) |
| <i>S. aureus</i> | 14 (26 %) | 6 (24 %) | 8 (28 %) |
| KNS ^b | 10 (18 %) | 8 (32 %) | 2 (7 %) |

^a TKE, Totale Knie-Endoprotehese; THE, Totale Hüft-Endoprothese

^b Die KNS Stämme umfassen 4 *S. capitis* und 3 *S. lugdunensis* Stämme, sowie je 1 *S. caprae*, *S. haemolyticus* und *S. warneri* Stamm.

5.1.2 Klonalitätsprüfung

Grundvoraussetzung für valide Ergebnisse ist die ausschließliche Untersuchung von definitiven Infektionsstämmen. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch die Analyse von Kontaminationsstämmen zu verhindern, wurden strenge Kriterien zur Definition der Infektionsstämme verwendet. Hierbei wird davon ausgegangen, dass es sich bei einem Isolat dann um einen klinisch signifikanten Infektionsstamm handelt, wenn dieser in zwei unabhängig gewonnen Materialien nachgewiesen werden kann [Ince *et al.*, 2004]. Bei jedem Infektionsfall wurden daher zwei Isolate untersucht, wobei jeweils das erste aus einem präoperativen Gelenkspirat und das zweite aus einem sterilen intraoperativen Abstrich gewonnen wurde. Mittels PFGE von *SmaI* verdauter Ganz-Zell-DNA wurde die Klonalität der beiden Isolate geprüft. Bei einer Diskrepanz ≥ 3 verschiedener Banden galten die Isolate als nicht klonal identisch [Tenover *et al.*, 1995] (Abb. 5).

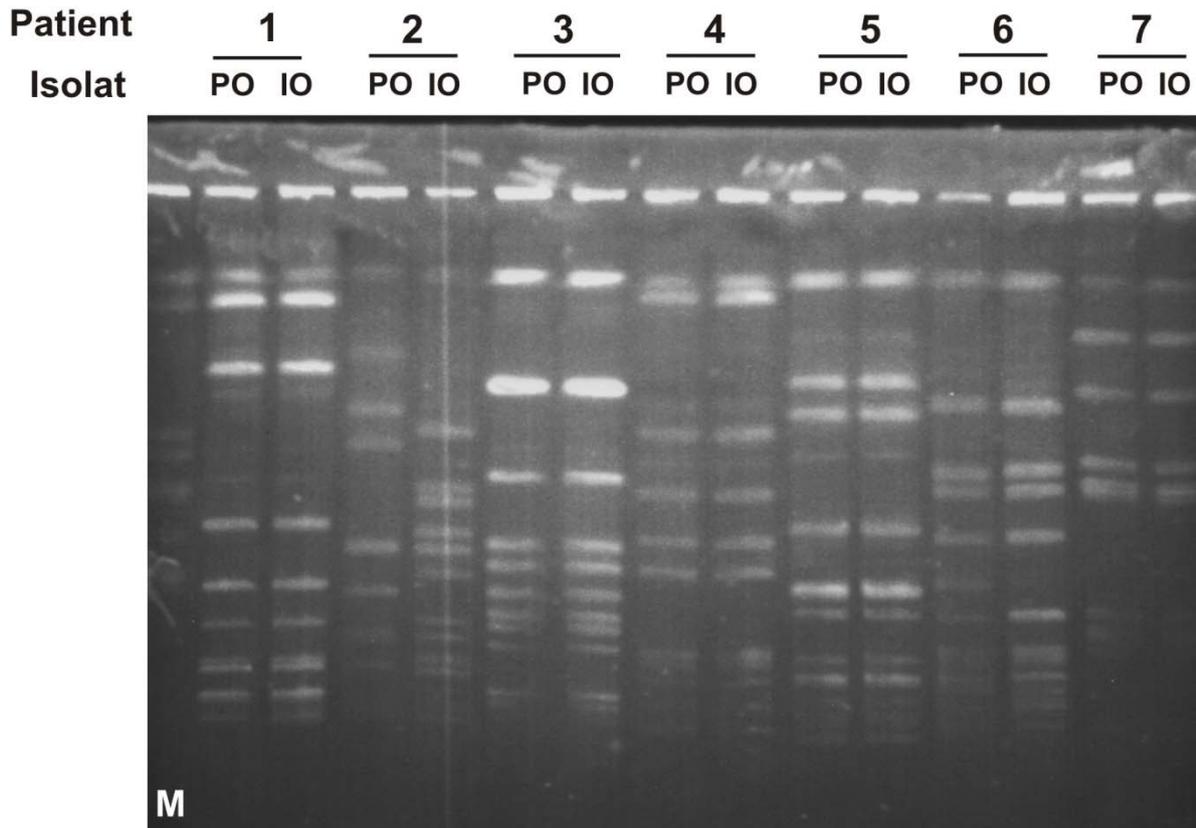


Abb. 5 Klonalitätsprüfung von *S. epidermidis* Isolaten aus Endoprotheseninfektionen. Die korrespondierenden, prä (po)- beziehungsweise intraoperativ (io) gewonnenen Isolate eines Patienten wurden hinsichtlich ihrer Klonalität mittels Pulsfeldgelelektrophorese von *Sma*I-gespaltener chromosomaler DNA geprüft. Dargestellt werden beispielhaft die Ergebnisse von sieben Patienten. Es wird deutlich, dass bei den Bandenmustern der von Patient 2 isolierten Stämme mehr als drei differente Banden nachgewiesen werden konnten. Daher können diese Stämme nicht als klonal betrachtet werden und wurden aus der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Bei allen anderen Patienten fanden sich keine Unterschiede der Bandenmuster zwischen prä- und intraoperativem Isolat. Hier handelte es sich demnach um klonal identische Stämme, die damit als klinisch signifikant angenommen werden konnten. Die elektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht. M: Marker.

Stämme, welchen die PFGE eine Klonalität beider Isolate demonstriert hatte, wurden in die Studie aufgenommen. Nur sie erfüllen die strikten mikrobiologischen Kriterien, die zur Annahme, dass es sich tatsächlich um Infektionsstämme und nicht um einfache Kontaminanten handelt, berechtigen [Ince *et al.*, 2004]. Dies traf bei den initial 57 Stämmen auf 54 zu, die übrigen 3 Stämme wurden aufgrund fehlender Klonalität ihrer Folgeisolate von der Stammsammlung ausgeschlossen.

Die Bakterienstämme unterschiedlicher Patienten zeigten keine klonalen Beziehungen, wodurch ein endemischer *S. epidermidis*- oder *S. aureus*-Klon als Infektionserreger mehrerer Patienten ausgeschlossen werden konnte. Die hier untersuchten Prothesen-Infektionen wurden somit durch unabhängige Staphylokokkenstämme verursacht. Dies ist von ausschlaggebender Bedeutung für die Validität der nachfolgend beschriebenen, molekularen und phänotypischen Charakterisierung.

5.2 Molekulare Epidemiologie Biofilm-assoziiierter Gene und phänotypische Ausprägung der Biofilmbildung

In diesem Abschnitt der Arbeit sollten Kenntnisse über die molekulare Epidemiologie der für die Biofilmbildung essentiellen Virulenzfaktoren gewonnen werden. Zudem sollte die phänotypische Ausprägung der Biofilmbildung und ihre Assoziation mit definierten Genen untersucht werden.

5.2.1 *S. aureus*: Molekulare Epidemiologie Biofilm-assoziiierter Gene und phänotypische Ausprägung der Biofilmbildung

Insgesamt wurden 14 *S. aureus* Stämme untersucht. Die Darstellung der jeweiligen Gene erfolgte durch PCR unter Verwendung der in Tab. 7 genannten Gen-spezifischen Primer.

5.2.1.1 Gene, die für Faktoren des primären Attachments kodieren

Die Gene *fnbA*, *clfA*, *clfB*, *sdrC* und *map/eap*, die für einen Teil der sogenannten MSCRAMMs kodieren und eine essentielle Bedeutung für das primäre Attachment haben, waren in allen *S. aureus* Isolaten vorhanden. Die Gene *sdrD*, *sdrE* und *ebpS*, ebenfalls der MSCRAMM-Familie zugehörig, wurden in circa zwei Dritteln der untersuchten Bakterienstämme gefunden. *SasG*, *cna*, *bbp* und *spa* fanden sich in $\leq 50\%$ der Isolate. Dies ist insbesondere im Falle des *cna* von Bedeutung, da dieses Gen als Marker für hoch virulente Stämme beschrieben wurde, speziell im Kontext von muskuloskeletalen Infektionen [Cassat *et al.*, 2005;Booth *et al.*, 2001], und in dieser Stammsammlung in 79 % der *S. aureus* Stämme fehlte.

Bbp und *sdrE* hingegen waren, entweder alleine oder in Kombination, in 79 % aller *S. aureus* Stämme zu finden. *Bbp* und *SdrE* zeigen signifikante Sequenzhomologien und es gibt Hinweise, dass sie Allele eines stark divergenten Lokus [Peacock *et al.*, 2002;Cassat *et al.*, 2005;Tung *et al.*, 2000] repräsentieren. Sie tragen vermutlich die gleiche Funktion. Somit präsentieren die meisten der *S. aureus* Isolate dieser Stammsammlung die Fähigkeit, an dem im Knochen abundanten *Bone Sialoprotein* zu adhären.

Das Gen *bap* war in keinem der *S. aureus* Stämme vorhanden.

5.2.1.2 Gene, die für Faktoren der Akkumulation kodieren

Der *icaADBC* Lokus, der die Enzyme der PIA-Synthese kodiert [Mack *et al.*, 1996a;Heilmann *et al.*, 1996], war in allen *S. aureus* Stämmen dieser Stammsammlung vorhanden. Das Gen *sasG* war in einem Drittel der untersuchten Stämme zu finden. Das Zellwandprotein SasG teilt signifikante Homologien mit dem interzellulären Adhäsins Aap von *S. epidermidis* [Rohde

et al., 2005;Roche *et al.*, 2003b]. Damit bieten ca. 33 % der untersuchten *S. aureus* Stämme eine mögliche additive Form des Zell-Zell-Kontaktes zur oben genannten PIA vermittelten, interzellulären Adhäsion.

5.2.1.3 Prävalenz von *mecA*

Das für das PBP2A kodierende und somit die Methicillin-Resistenz vermittelnde *mecA* Gen [Horstkotte *et al.*, 2002] war bei etwa einem Drittel der *S. aureus* Stämme zu finden. In den Isolaten, die bei Endoprotheseninfektionen nach THE isoliert wurden, war es häufiger vorhanden als in den Isolaten bei Endoprotheseninfektionen nach TKE (THE 38 %, TKE 17 %).

Eine Übersicht der Prävalenz der untersuchten Gene liefert Abb. 6.

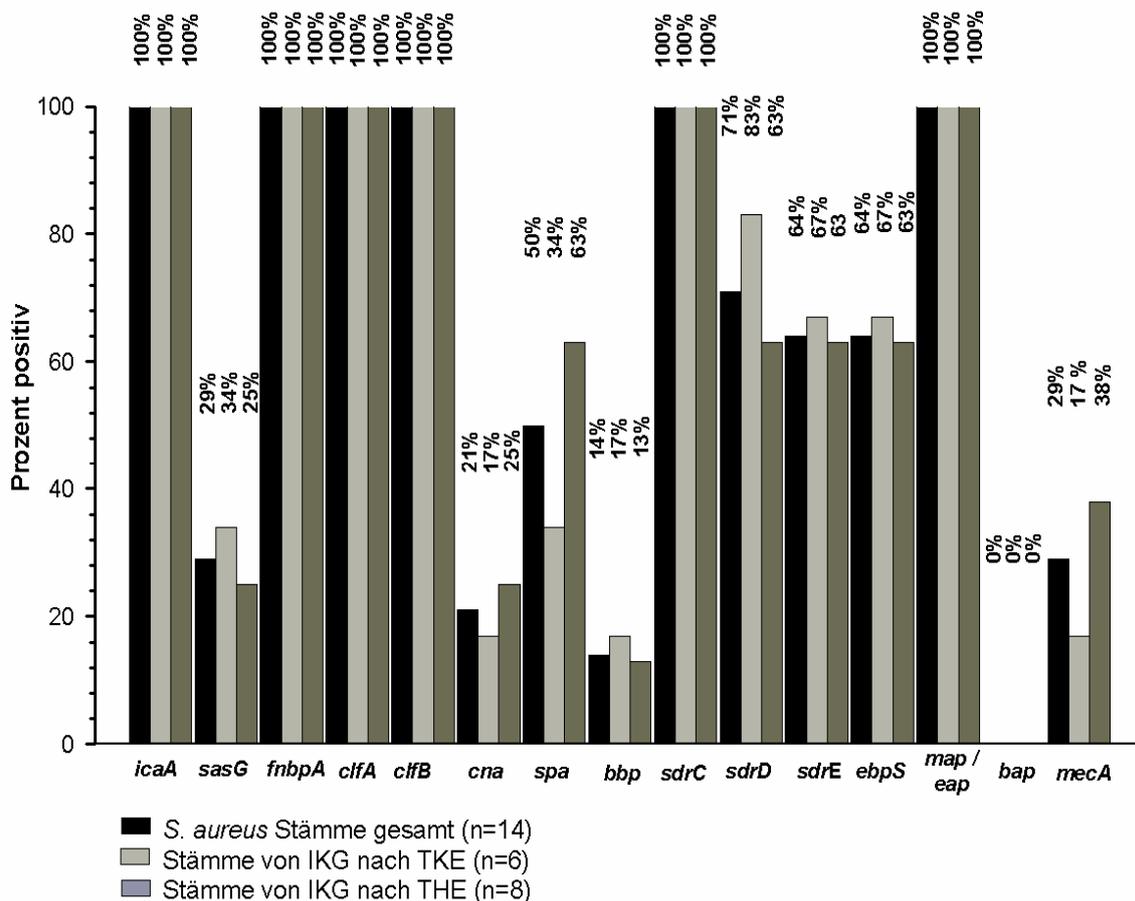


Abb. 6 Darstellung der Prävalenz Virulenz-assoziierter Gene der *S. aureus* Stämme von periprosthetischen Infektionen nach TKE und THE.

5.2.1.4 Analyse des Biofilmphänotyps

Alle *S. aureus* Stämme dieser Sammlung waren biofilmpositiv (Tab. 9). In keinem der Fälle war zwischen dem jeweils prä- und intraoperativ gewonnenen Isolat ein Wechsel des Biofilmphänotyps zu beobachten. Somit kann der Biofilmphänotyp der hier untersuchten *S. aureus* Stämme als stabil betrachtet werden. Die Untersuchung der Biofilmquantität zeigte, dass 86 % der *S. aureus* Stämme einen schwachen Biofilm produzierten. Lediglich 14 % synthetisierten starke Biofilme mit einer Absorption von $A_{570} \geq 1,0$ in der Biofilmtestung.

100 % der *S. aureus* Isolate waren *icaADBC*-positiv und synthetisierten das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsin PIA. Dieser Aspekt weist darauf hin, dass PIA für die Biofilmbildung von *S. aureus* bei Endoprotheseninfektionen nach TKE und THE ein wichtiger Faktor zu sein scheint.

Tab. 9 Biofilm Phänotyp und *icaADBC* Genotyp der *S. aureus* Stämme von periprothetischen Infektionen nach TKE und THE

| Spezies | Biofilmpositiv ^a | | Biofilmmnegativ ^a | |
|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | <i>icaADBC</i> -positiv ^b | <i>icaADBC</i> -negativ ^c | <i>icaADBC</i> -positiv ^b | <i>icaADBC</i> -negativ ^c |
| <i>S. aureus</i> | | | | |
| TKE (n=6) | 6/6 (100%) | 0 | 0 | 0 |
| THE (n=8) | 8/8 (100%) | 0 | 0 | 0 |

^a*S. epidermidis* 1457 und 1475-M10 fungierten als Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle.

^bAlle *icaADBC*- und biofilmpositiven Stämme waren PIA-positiv, alle *icaADBC*-positiven und biofilmmnegativen Stämme waren PIA-negativ.

^cAlle *icaADBC*-negativen, biofilmpositiven und biofilmmnegativen Stämme waren PIA-negativ.

Um diese Hypothese zu testen, wurden etablierte *S. aureus* Biofilme mit der spezifisch PIA-degradierenden β -1,6-Hexosaminidase DspB behandelt. Durch diese Maßnahme wurden alle von *S. aureus* produzierten Biofilme desintegriert. Das Ausmaß der Biofilmeradikation lag bei 91 – 98 % (Abb. 7, Abb. 8). Dies zeigt, dass PIA tatsächlich an der Stabilität von *S. aureus* Biofilmen beteiligt ist. Erstaunlicherweise führte die Exposition etablierter Biofilme gegenüber Trypsin ebenfalls zu einer Desintegration der *S. aureus* Biofilme. Das Ausmaß der Biofilmeradikation durch Trypsin lag bei 92 – 99 % (Abb. 7, Abb. 8). Diese Resultate demonstrieren, dass bei der Biofilmetablierung von *S. aureus* zusätzlich zu PIA auch Proteinfaktoren eine große Rolle spielen. Da die Trypsin-sensitiven Biofilme bei den Isolaten von Endoprotheseninfektionen nach TKE und THE eine identische Verteilung zeigten, scheint dies auch in unterschiedlichen klinischen Situationen von Bedeutung zu sein.

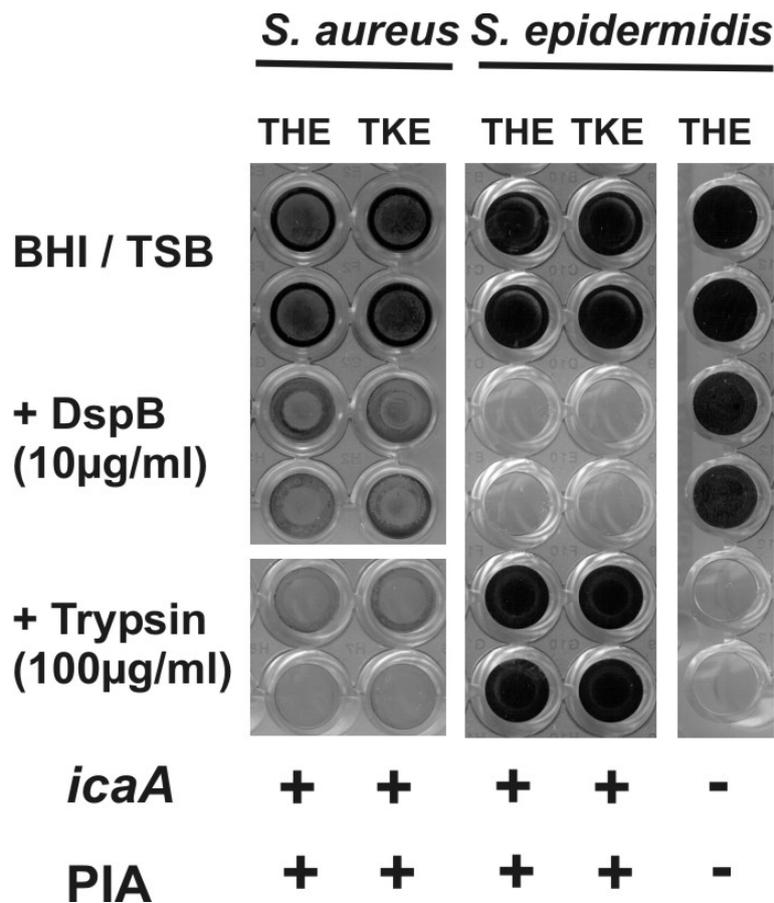


Abb. 7 Darstellung des Einflusses von Trypsin und Dispersin B auf repräsentative Biofilme von *S. aureus* und *S. epidermidis*. Die Biofilme von PIA-positiven *S. aureus* Stämmen aus periprothetischen Infektionen nach TKE und THE werden durch Trypsin und Dispersin B aufgelöst. Biofilme von *S. epidermidis* aus periprothetischen Infektionen nach TKE und THE sind entweder gegenüber Dispersin B (PIA-positiv) oder Trypsin (PIA-negativ) sensibel. Die Präsenz von *icaA* und der PIA-Synthese ist angegeben. Medium (*S. aureus*: BHI + 2 % Saccharose und 2 % Glucose; *S. epidermidis*: TSB) ohne das entsprechende Enzym diente als Negativkontrolle.

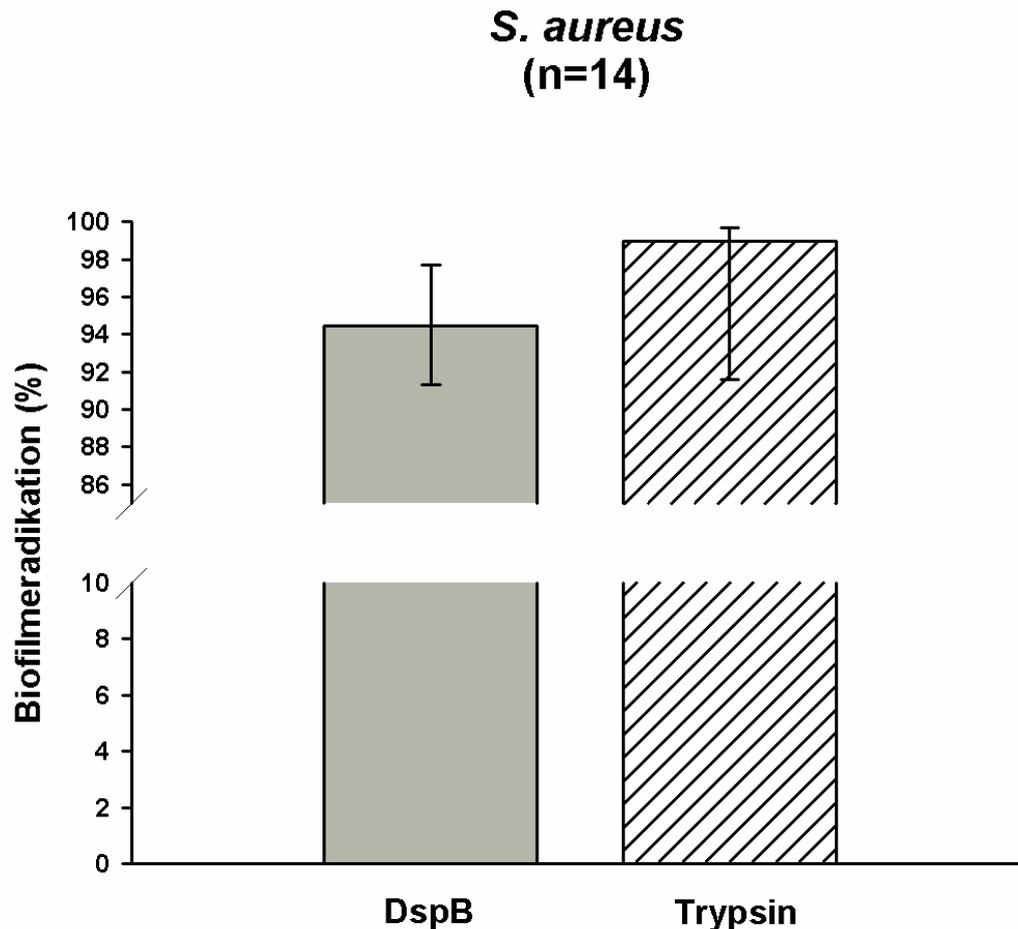


Abb. 8 Range Plot der Biofilmdesintegration durch Dispersin B und Trypsin. Darstellung der Biofilmeradikation in Prozent von *S. aureus* (n=14) Stämmen durch die β -1,6,-Hexosaminidase DspB und Trypsin. Die Biofilmeradikation in Prozent wurde unter Anwendung der Formel $(1 - A_{570} \text{ mit Enzym} / A_{570} \text{ ohne Enzym}) \times 100$ berechnet. Für jeden Stamm basiert die mittlere A_{570} auf 6 Messwerten, die in jeweils zwei unabhängigen Experimenten ermittelt wurden. Die Säulen repräsentieren jeweils den Mittelwert, der obere Fehlerbalken die maximale und der untere Fehlerbalken jeweils die minimalste prozentuale Eradikation.

5.2.2 *S. epidermidis*: Molekulare Epidemiologie Biofilm-assoziiierter Gene und phänotypische Ausprägung der Biofilmbildung

Insgesamt wurden 30 *S. epidermidis* Stämme untersucht. Die Darstellung der jeweiligen Gene erfolgte durch PCR unter Verwendung der in Tab. 7 genannten Gen-spezifischen Primer.

5.2.2.1 Gene, die für Faktoren des primären Attachments kodieren

Die Gene *fbe* und *atlE* fanden sich in allen *S. epidermidis* Isolaten dieser Stammsammlung. Das für ein Fibronectin-Adhäsion kodierende *embp* war in 90 % der untersuchten *S. epidermidis* Stämme vorhanden. Circa ein Drittel der *S. epidermidis* Stämme war *bhp*-positiv. *Bhp* kodiert für ein Protein, das homolog zu dem aus *S. aureus* bekannten Bap ist [Mack *et al.*, 2006b]. Die Prävalenz der hier untersuchten Gene zeigte keine signifikant differentielle Ver-

teilung in der Gruppe der *S. epidermidis* Isolate aus Endoprotheseninfektionen nach TKE und THE.

5.2.2.2 Gene, die für Faktoren der Akkumulation kodieren

Der für die PIA-Synthese essentielle *icaADBC*-Lokus war bei 50 % aller *S. epidermidis* Isolate zu finden. Interessanterweise wies die *icaADBC*-Prävalenz zwischen den *S. epidermidis* Stämmen von Endoprotheseninfektionen nach TKE und THE eine signifikant differente Verteilung auf. Die Isolation eines *icaADBC*-positiven *S. epidermidis* Stammes war in den Isolaten von Endoprotheseninfektionen nach TKE wahrscheinlicher als in denen nach THE (TKE 73 %, THE 36 %; $p=0,0291$; einseitiger Chi-Quadrat-Test). Demnach scheint der *icaADBC*-Lokus für periprothetische Infektionen im spezifischen Kontext der TKE eine bedeutendere Rolle zu spielen als für den der THE. Grundsätzlich ist der *icaADBC*-Lokus nicht in jedem Fall essentielle Voraussetzung für die Etablierung eines Biofilms bei den *S. epidermidis* Stämmen. Im Rahmen Endoprothesen-assoziiertes Infektionen nach TKE und THE durch *S. epidermidis* müssen somit auch PIA-unabhängige Faktoren der interzellulären Adhäsion aktiv sein. Ein solches alternatives interzelluläres Adhäsion von *S. epidermidis* stellt das zellwandgebundene Aap dar.

Aap war bei 80 % aller *S. epidermidis* Isolate vorhanden. Im Gegensatz zu *icaADBC* fand sich *aap* häufiger in *S. epidermidis* Stämmen von Endoprotheseninfektionen nach THE (84 %) als in solchen von Endoprotheseninfektionen nach TKE (73 %). In 4 von 5 *icaADBC*-negativen und biofilmpositiven Isolaten von Protheseninfektionen nach THE war *aap* vorhanden. Somit könnte Aap in diesen Isolaten möglicherweise der entscheidende Faktor für die Biofilmentstehung sein.

5.2.2.3 Weitere Virulenz-assoziierte Gene

Das für die Methicillin-Resistenz der Staphylokokken verantwortliche *mecA* Gen war bei 80 % der *S. epidermidis* Isolate zu finden. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen aus Prothesen-assoziierten Infektionen nach TKE und THE. *IS257*, ein mobiles genetisches Element, welches in klinischen und kommensalen Stämmen vorkommt [Rohde *et al.*, 2004; Rohde *et al.*, 2001b], war in allen *S. epidermidis* Stämmen dieser Stammsammlung vorhanden. *IS256*, ebenfalls ein mobiles genetisches Element, das in die Kontrolle der PIA-Synthese eingreift [Ziebuhr *et al.*, 1999], war in etwa zwei Dritteln der Isolate zu finden. Auch hier lag keine signifikante Differenz zwischen den Isolaten von Endoprotheseninfektionen nach TKE und THE vor.

Eine Übersicht der Prävalenz der untersuchten Gene liefert Abb. 9.

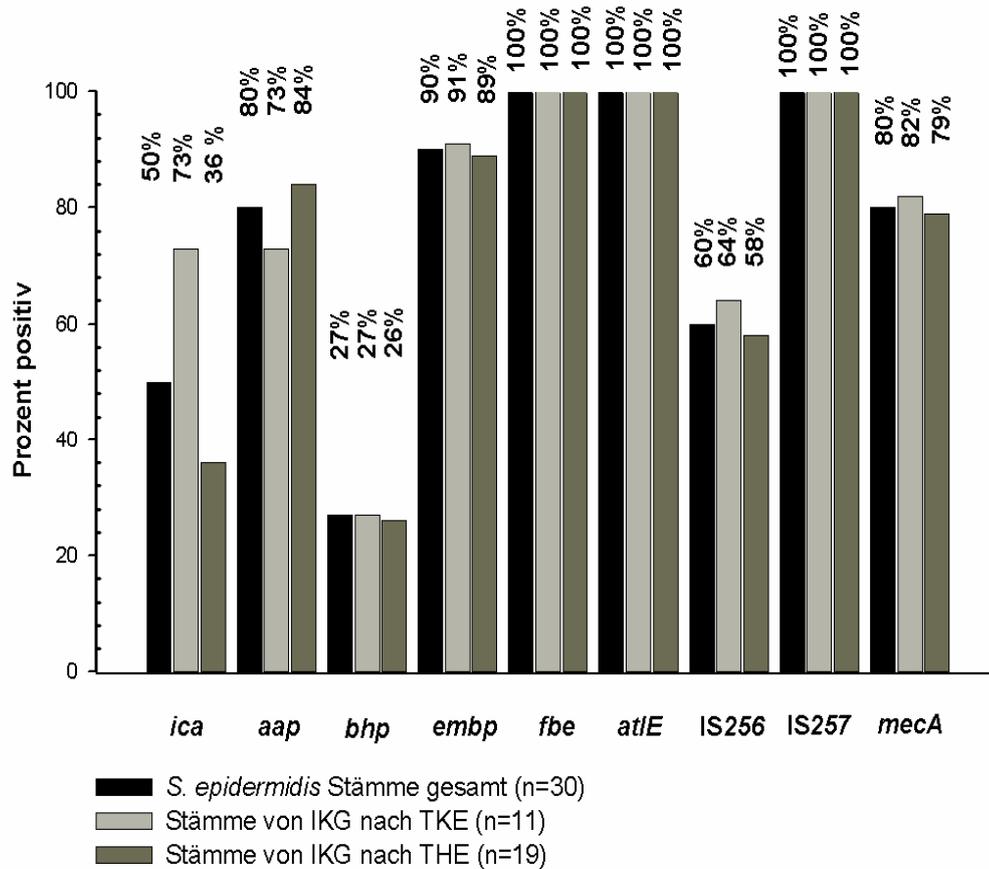


Abb. 9 Darstellung der Prävalenz Virulenz-assoziiierter Gene der *S. epidermidis* Stämme von periprosthetischen Infektionen nach TKE und THE.

5.2.2.4 Analyse des Biofilmphänotyps

Sowohl bei den Isolaten aus Infektionen nach TKE als auch in denen nach THE war etwa die Hälfte der Stämme biofilmpositiv. Den 55 % (6 von 11) biofilmpositiven Stämmen aus Infektionen nach TKE standen 63 % (12 von 19) aus Infektionen nach THE gegenüber.

Alle biofilmpositiven *S. epidermidis* Stämme aus Infektionen nach TKE waren auch *icaADBC*-positiv (Tab. 10). Im Gegensatz dazu bildeten 5 von 12 *S. epidermidis* Stämmen aus Infektionen nach THE einen Biofilm trotz des Fehlens von *icaADBC* (Tab. 10). Dies zeigt, dass *icaADBC* keine notwendige Voraussetzung für die Entstehung von *S. epidermidis* Biofilmen ist.

Tab. 10 Biofilm Phänotyp und *icaADBC* Genotyp der *S. epidermidis* Stämme von periprothetischen Infektionen nach TKE und THE

| Spezies | Biofilmpositiv ^a | | Biofilmnegativ ^a | |
|-----------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | <i>icaADBC</i> -positiv ^b | <i>icaADBC</i> -negativ ^c | <i>icaADBC</i> -positiv ^b | <i>icaADBC</i> -negativ ^c |
| <i>S. epidermidis</i> | | | | |
| TKE (n=11) | 6/6 (100%) | 0 | 2/5 (40%) | 3/5 (60%) |
| THE (n=19) | 7/12 (58%) | 5/12 (42%) | 0 | 7/7 (100%) |

^a*S. epidermidis* 1457 und 1475-M10 fungierten als Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle.

^bAlle *icaADBC*- und biofilmpositiven Stämme waren PIA-positiv, alle *icaADBC*-positiven und biofilmnegativen Stämme waren PIA-negativ.

^cAlle *icaADBC*-negativen, biofilmpositiven und biofilmnegativen Stämme waren PIA-negativ.

Der Biofilm der PIA-positiven Stämme wurde praktisch vollständig durch die spezifisch PIA-degradierenden β -1,6-Hexosaminidase DspB aufgelöst (Abb. 7, Abb. 10). Die Biofilmeradikation lag hier bei 97 – 100 %. Interessanterweise waren diese Biofilme dem Trypsinverdau gegenüber weitestgehend resistent (Abb. 7, Abb. 10). Somit scheint bei diesen Stämmen PIA wesentlich für die interzelluläre Adhäsion und Biofilmbildung zu sein. Im Gegensatz dazu wurden die Biofilme der fünf *icaADBC*- und PIA-negativen Stämme aus Endoprotheseninfektionen nach THE mit einer Biofilmeradikation von 89 – 100 % durch Trypsin zersetzt, während DspB keinen Effekt auf diese Biofilme zeigte. Die Ergebnisse demonstrieren, dass in diesen Isolaten offensichtlich ein PIA-unabhängiger, Protein-vermittelter Mechanismus der interzellulären Adhäsion aktiv ist, der PIA funktionell ersetzt.

Es wurde kein *icaA*-positiver, PIA-negativer Stamm registriert, der einen Protease-sensitiven Biofilm gebildet hat.

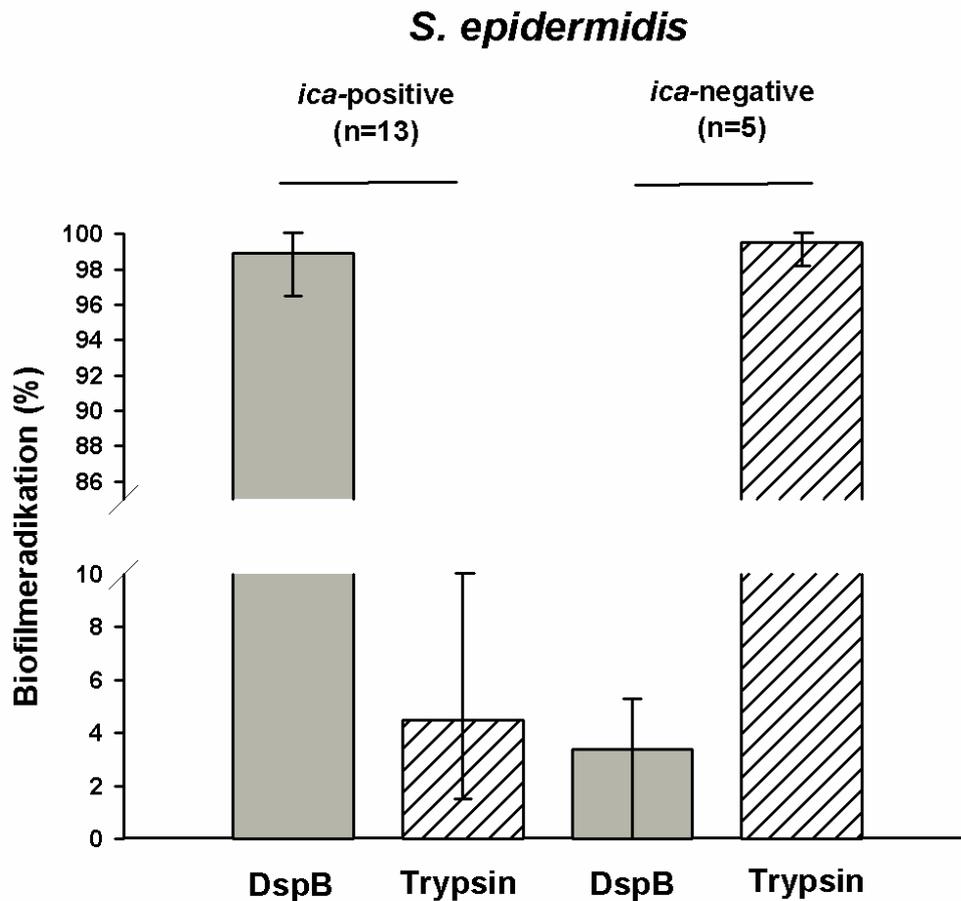


Abb. 10 Range Plot der Biofilmesintegration durch Dispersin B und Trypsin. Darstellung der Biofilmeradikation in Prozent von *icaADBC*-positiven (n=13) und *icaADBC*-negativen (n=5) *S. epidermidis* Stämmen durch die β -1,6,-Hexosaminidase DspB und Trypsin. Die Biofilmeradikation in Prozent wurde unter Anwendung der Formel $(1 - A_{570 \text{ mit Enzym}} / A_{570 \text{ ohne Enzym}}) \times 100$ berechnet. Für jeden Stamm basiert die mittlere A_{570} auf 6 Messwerten, die in jeweils zwei unabhängigen Experimenten ermittelt wurden. Die Säulen repräsentieren jeweils den Mittelwert, der obere Fehlerbalken die maximale und der untere Fehlerbalken jeweils die minimalste prozentuale Eradikation.

S. epidermidis Stämme, die einen Protein-vermittelten Biofilm produzierten, zeigten einen deutlich schwächeren Biofilmphänotyp als solche, die PIA synthetisierten. Bei den Protein-vermittelten Biofilmen waren 5 von 5 Stämmen schwache Biofilmbildner. Bei den Stämmen, die einen PIA-abhängigen Biofilm bildeten, waren mehr als die Hälfte stark biofilmpositiv (5 von 13 schwach, 8 von 13 stark biofilmpositiv). Zudem war die phänotypische Expression eines Protein-abhängigen Biofilms weniger stabil als die eines PIA-abhängigen. Dies zeigte sich in einem Wechsel des Phänotyps von biofilmpositiv zu biofilmnegativ *et vice versa* zwischen den prä- und intraoperativen gewonnenen Isolaten eines Patienten. Bei den Protein-vermittelt biofilmbildenden Stämmen wechselten 4 von 5, bei den PIA-vermittelt biofilmbildenden Stämmen 3 von 13 den Biofilmphänotyp.

Funktionelle Bedeutung des *Accumulation associated proteins* (Aap) bei der PIA unabhängigen *S. epidermidis* Biofilmbildung

Wie bereits beschrieben, war das interzelluläre Adhäsion Aap mit 84 % häufiger in den Stämmen von periprothetischen Infektionen nach THE als mit 73 % in denen nach TKE zu finden. In 4 von 5 *icaADBC*-negativen und biofilmpositiven Isolaten von Endoprotheseninfektionen nach THE konnte *aap* nachgewiesen werden. Daher erschien es möglich, dass Aap bei diesen Isolaten funktionell an der Biofilmproduktion beteiligt sein könnte. Um diese Hypothese zu testen, wurde ein Aap-Domäne-B-spezifisches Antiserum in Biofilminhibitionsstudien eingesetzt. Hierbei sollte überprüft werden, ob durch Interferenz mit Aap die Biofilmbildung bei diesen Stämmen gehemmt werden kann.

Tatsächlich konnte die Biofilmbildung bei allen Stämmen konzentrationsabhängig bis zu einer Verdünnung von 1:6400 (Abb. 11) inhibiert werden. Das Präimmunsrum, das keine Aap-spezifischen Antikörper enthält [Rohde *et al.*, 2007], führte lediglich bei niedriger Verdünnung bis 1:200 zu einer Inhibition der Biofilmbildung. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Aap an der Biofilmbildung dieser Isolate funktionell beteiligt ist. Die schwache inhibitorische Aktivität des Präimmunsrums kann auf die Anwesenheit von Antikörpern zurückzuführen sein, die gegen Aap-unabhängige Oberflächenstrukturen von *S. epidermidis* gerichtet sind, welche jedoch ebenfalls an der Biofilmbildung beteiligt sind. Hierbei könnte es sich beispielsweise um Aap-Interaktionspartner handeln.

Auf die Biofilmproduktion von 10 zufällig ausgewählten, PIA-produzierenden, *aap*-positiven Stämmen hatte das Aap-Domäne-B-spezifische Antiserum keinen Einfluss.

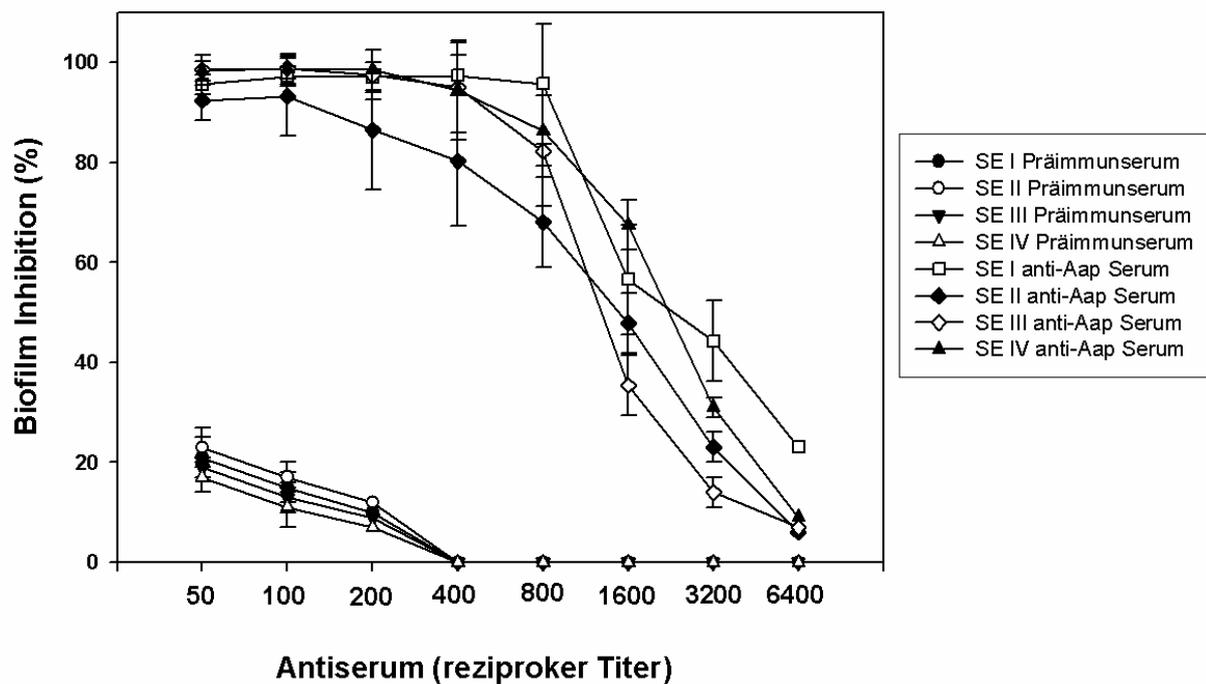


Abb. 11 Relative Inhibition der Biofilmbildung von 4 *aap*-positiven, *ica*-negativen *S. epidermidis* Stämmen (SE I, SE II, SE III und SE IV) unter Verwendung eines Aap-Domäne-B-spezifischen Antiserums sowie des korrespondierenden Präimmuns. Die Inhibition in Prozent wurde mit Hilfe der Formel $[(1 - A_{570} \text{ mit Antiserum}) / A_{570} \text{ ohne Antiserum}] \times 100$ berechnet.

Polymorphismus der repetitiven Aap Domäne-B bei *S. epidermidis*

Die Domäne-B von Aap ist durch eine variable Zahl von repetitiven Subdomänen charakterisiert [Rohde *et al.*, 2005; Monk and Archer, 2007]. Die Zahl der repetitiven Einheiten wurde mittels PCR unter Verwendung von Primern, die direkt vor beziehungsweise hinter der Domäne-B binden, ermittelt. In der hier untersuchten Sammlung von *S. epidermidis* Stämmen konnten *repeat*-Zahlen zwischen 5 und 17 gefunden werden. Die Untersuchung der zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen Isolate eines Patienten zeigte, dass die Zahl der *repeats* nicht konstant ist, sondern vielmehr im Laufe einer Infektion variiert. Infolge des Verlustes von 3 bis 10 *repeats* war diese Domäne bei 4 von 30 *S. epidermidis* Stämmen in den Isolaten der intraoperativen Gewebeprobe deutlich kürzer, verglichen mit dem korrespondierenden Isolat des präoperativen Gelenkspirats (Abb. 12). Bei einem Stamm war die Domäne-B des Isolates der intraoperativen Gewebeprobe 3 *repeats* länger als die des präoperativen Isolats (Abb. 12). Größenalterationen der Domäne-B fanden sich sowohl in *icaADBC*-positiven (4 von 5) als auch in *icaADBC*-negativen (1 von 5) Stämmen, zeigten aber keine Assoziation mit signifikanten Änderungen des Biofilmphänotyps.

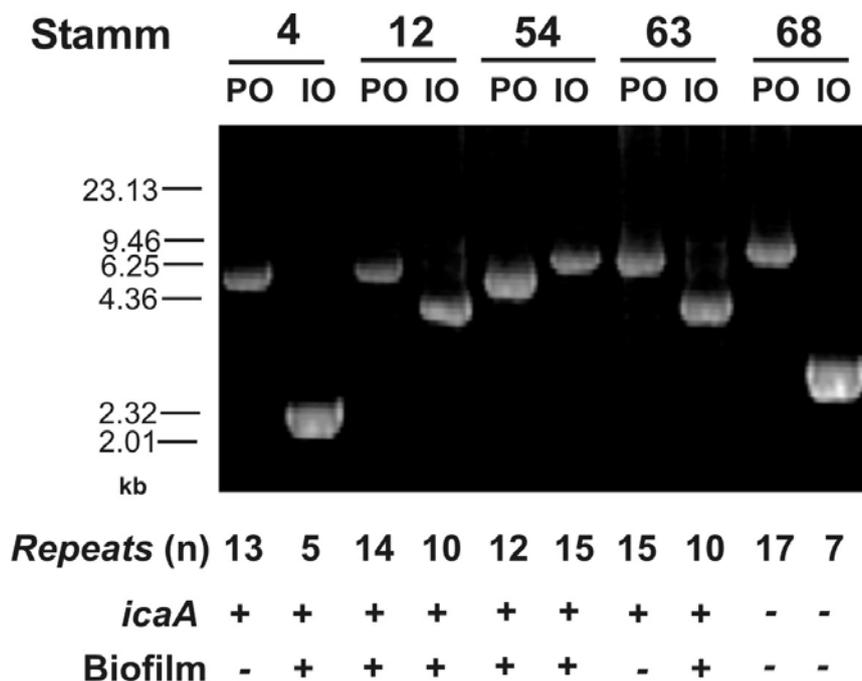


Abb. 12 Vergleich der Domäne-B von *aap* bei korrespondierenden *S. epidermidis* Stämmen, welche zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten (PO: präoperatives Gelenkspiralat; IO: intraoperative Gewebeprobe) während der Infektionsperiode isoliert wurden. Die repetitive Domäne-B wurde unter Verwendung von Primern, die direkt vor beziehungsweise hinter der Domäne-B binden, amplifiziert. Die resultierenden Amplikons wurden in einem 0,7 % Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Die Anzahl der 384-Nukleotid großen *repeats* wurde von der Amplikongröße abgeleitet. Die Präsenz von *icaA* sowie der Biofilm-Phänotyp sind angegeben.

5.2.3 Molekulare Epidemiologie und phänotypische Ausprägung der Biofilmbildung der *S. epidermidis* unabhängigen KNS Stämme

Insgesamt wurden 10 KNS Stämme untersucht. Sie setzen sich aus 4 *S. capitis* und 3 *S. lugdunensis* Stämmen, sowie je einem *S. caprae*, *S. haemolyticus* und *S. warneri* Stamm zusammen.

Die Biofilmproduktion war bei 70 % der KNS Stämme phänotypisches Merkmal. In keinem der Fälle war zwischen dem jeweils prä- und intraoperativ gewonnenen Isolat ein Wechsel des Biofilmphänotyps zu beobachten. Der Biofilmphänotyp der hier untersuchten KNS Stämme kann somit als stabil betrachtet werden. In 5 von 7 (71 %) Fällen etablierten die KNS Stämme starke Biofilme mit einer Absorption von $A_{570} \geq 1,0$ in der Biofilmtestung. Die übrigen 29 % der biofilmpositiven KNS Stämme synthetisierten schwache Biofilme. Unter den biofilmpositiven KNS Isolaten waren 2 von 7 *icaADBC*-negativ (Tab. 12). Da diese Stämme ebenfalls *aap*-negativ waren, könnten in diesen beiden Fällen alternative Strukturen für die interzelluläre Adhäsion verantwortlich sein.

Tab. 11 Biofilm Phänotyp und *icaADBC* Genotyp der KNS Stämme von periprothetischen Infektionen nach TKE und THE

| Spezies | Biofilmpositiv ^a | | Biofilmmnegativ ^a | |
|-----------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | <i>icaADBC</i> -positiv ^b | <i>icaADBC</i> -negativ ^c | <i>icaADBC</i> -positiv ^b | <i>icaADBC</i> -negativ ^c |
| KNS | | | | |
| TKE (n=8) | 3/5 (60%) | 2/5 (40%) | 1/3 (33%) | 2/3 (67%) |
| THE (n=2) | 2/2 (100%) | 0 | 0 | 0 |

^a*S. epidermidis* 1457 und 1475-M10 fungierten als Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle.

^bAlle *icaADBC*- und biofilmpositiven Stämme waren PIA-positiv, alle *icaADBC*-positiven und biofilmmnegativen Stämme waren PIA-negativ.

^cAlle *icaADBC*-negativen, biofilmpositiven und biofilmmnegativen Stämme waren PIA-negativ.

^dDie KNS umfassen 4 *S. capitis*, 3 *S. lugdunensis*, 1 *S. caprae*, 1 *S. haemolyticus* und 1 *S. warneri*

Der *icaADBC*-Lokus war in circa zwei Dritteln aller KNS Stämme zu finden. Demnach ist das interzelluläre Adhäsion PIA auch bei den KNS Stämmen dieser Sammlung im Rahmen von Infektionen prothetisch versorgter Knie- und Hüftgelenke von Bedeutung. Das, wie bereits beschrieben, ebenfalls interzelluläre Adhäsion vermittelnde Aap war bei 10 % (n=1) der untersuchten Isolate vorhanden.

Fbe und *atlE* waren ebenfalls jeweils nur bei einem der Isolate Bestandteil des Genoms. Gleiches gilt für das mobile genetische Element *IS256*. Die Gene *bhp* und *embp* waren in keinem der KNS Stämme zu finden. Im Gegensatz dazu waren alle KNS Stämme positiv für *IS257*.

Das für das PBP2A kodierende und somit die Methicillin-Resistenz vermittelnde *mecA* Gen [Horstkotte *et al.*, 2002] war bei circa einem Fünftel der KNS Stämme zu finden. Ein Vergleich der Genverteilung zwischen den Stämmen von periprothetischen Infektionen nach TKE und THE war aufgrund der niedrigen Fallzahlen nicht sinnvoll.

Eine Übersicht der Prävalenz der untersuchten Gene liefert Abb. 13.

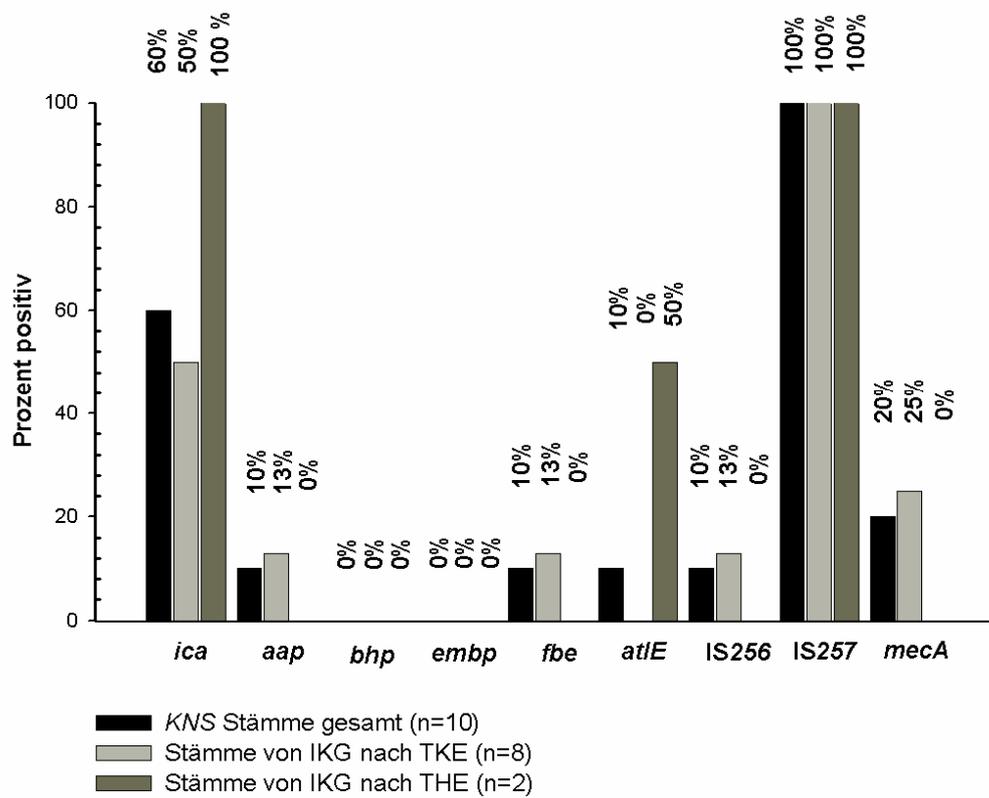


Abb. 13 Darstellung der Prävalenz Virulenz-assoziiierter Gene der KNS Stämme von periprosthetischen Infektionen nach TKE und THE. Die KNS setzen sich aus 4 *S. capitis* und 3 *S. lugdunensis* Stämmen, sowie je einem *S. caprae*, *S. haemolyticus* und *S. warneri* Stamm zusammen.

6 Diskussion

Mit dem Ziel, neue präventive und therapeutische Konzepte zu entwickeln, wurden Fremdkörper-assoziierte Infektionen durch Staphylokokken in den letzten Dekaden intensiv untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Fähigkeit von Staphylokokken zur Ausbildung mehrlagiger Biofilme auf implantierten Fremdkörpern entscheidend für die Entstehung einer Fremdkörperinfektion ist [Baddour *et al.*, 1986; Banerjee *et al.*, 1991; Christensen *et al.*, 1983; Christensen *et al.*, 1982; Christensen *et al.*, 1985; Davenport *et al.*, 1986; Deighton and Balkau, 1990; Dunne, Jr. *et al.*, 1987; Ishak *et al.*, 1985]. Trotz des mittlerweile breiten Wissens über funktionelle Charakteristika Fremdkörperkolonisation vermittelnder Adhäsine ist bislang erst sehr wenig über die relative Bedeutung spezifischer Biofilm-assoziiierter Virulenzfaktoren in definierten klinischen Situationen bekannt. Das kann unter anderem auf das Problem zurückgeführt werden, dass vor allem im Hinblick auf *S. epidermidis* die Unterscheidung von klinisch signifikantem Isolat und einfacher Kontaminante schwierig ist. Somit müssen viele epidemiologische Studien zurückhaltend bewertet werden, da nicht sichergestellt ist, ob wirklich invasive Isolate untersucht wurden.

Die Prävalenz von Virulenz-assoziierten Genen in klinischen Staphylokokken-Populationen ist insbesondere vor dem Hintergrund von Bedeutung, dass zur Definition potentieller bakterieller Strukturen als Basis eines Impfstoffes geklärt sein muss, dass diese auch in den relevanten klinischen Isolaten gefunden werden können. Aus diesem Grund wurden im Gegensatz zu anderen epidemiologischen Studien, welche die Prävalenz von Virulenzfaktoren in Staphylokokken-Populationen aus periprothetischen Infektionen untersucht haben [Galdbart *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 2005; Galdbart *et al.*, 2000], in dieser Arbeit streng definierte Kriterien zur Identifikation klinisch signifikanter Infektionsstämme angewendet [Sia *et al.*, 2005; Geipel and Herrmann, 2005]. Der rigorose Ausschluss von Kontaminationsstämmen ist Grundvoraussetzung für den Erhalt valider epidemiologischer Ergebnisse. Auf diese Weise können verlässliche Schlussfolgerungen gezogen werden, selbst wenn es sich, wie in der vorliegenden Untersuchung, um kleinere Populationen handelt.

Im Gegensatz zu Toxin-vermittelten Infektionen von *S. aureus*, die in der Regel durch ein definiertes Toxin-kodierendes Gen determiniert sind, basiert die Virulenz von Staphylokokken im Kontext Fremdkörper-assoziiierter Infektionen auf einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Faktoren [Peacock *et al.*, 2002; Cassat *et al.*, 2005]. Die relative Bedeutung ein-

zelter Faktoren kann einerseits von dem verwendeten Material, andererseits vom Ort der Infektion abhängig sein [de Silva *et al.*, 2002;Peacock *et al.*, 2002;Cassat *et al.*, 2005;Rohde *et al.*, 2007;Rohde *et al.*, 2004;Arciola *et al.*, 2003]. Um solche subtilen Unterschiede in der Fähigkeit zur Biofilmbildung und im genetischen Hintergrund darzustellen, wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl das Potential zur Biofilmbildung als auch die Prävalenz Virulenz-assoziiertes Gene von streng definierten, klinisch signifikanten Staphylokokken aus periprothetischen Infektionen nach totaler Knie-Endoprothetik beziehungsweise totaler Hüft-Endoprothetik untersucht.

6.1 Molekulare Epidemiologie Biofilm-assoziiertes Gene und phänotypische Ausprägung der Biofilmbildung

Bereits frühe elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten zeigen, dass insbesondere *S. epidermidis* festhaftende Biofilme auf implantierten Fremdmaterialien ausbildet [Marrie *et al.*, 1982;Peters *et al.*, 1981]. Durch diese Erkenntnisse motiviert, wurde ein einfacher, gut reproduzierbarer Test entwickelt, der die Fähigkeit zur Biofilmbildung einzelner Staphylokokken-Isolate ermöglicht [Christensen *et al.*, 1985]. Unter Verwendung dieses als Mikrotiterplatten-Adhärenz-Tests bezeichneten Assays konnten verschiedene Autoren einen Zusammenhang zwischen klinischer Relevanz eines Isolats und seiner Fähigkeit zur Biofilmbildung aufzeigen [Christensen *et al.*, 1982;Baddour *et al.*, 1986;Deighton and Balkau, 1990;Dunne, Jr. *et al.*, 1987;Ziebuhr *et al.*, 1997]. Dieser Zusammenhang konnte jedoch nicht in jeder Untersuchung nachvollzogen werden [Alexander and Rimland, 1987;Beard-Pegler *et al.*, 1989;Needham and Stempsey, 1984]. Dies kann zum einen auf der heterogenen Expression eines biofilmpositiven Phänotyps unter verschiedenen Anzuchtbedingungen beruhen, jedoch zum anderen auch auf die Existenz unterschiedlicher Mechanismen der Biofilmbildung hinweisen [Mack *et al.*, 2006b]. Vor diesem Hintergrund war die phänotypische Charakterisierung der vorliegenden Stämme hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung eine zentrale Fragestellung.

Biofilmbildung war ein wichtiges phänotypisches Merkmal der *S. epidermidis* Stämme der hier untersuchten Stammsammlung. 60 % aller *S. epidermidis* Isolate präsentierten sich biofilmpositiv. Dieses Merkmal unterscheidet invasive *S. epidermidis* Stämme von kommensalen Isolaten, die nur selten biofilmpositiv sind [Knobloch *et al.*, 2002a;Ziebuhr *et al.*, 1997;Rohde *et al.*, 2004;de Silva *et al.*, 2002]. Überraschenderweise waren alle in dieser Arbeit untersuchten *S. aureus* Stämme biofilmpositiv. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu früher publizierten

Studien, in denen nur ein geringer Prozentsatz klinisch signifikanter *S. aureus* Blutkultur-Isolate Biofilme bilden konnte [Knobloch *et al.*, 2002a; Fowler, Jr. *et al.*, 2001]. Möglicherweise ist diese Diskrepanz auf die Verwendung eines die Expression biofilmpositiver Phänotypen begünstigenden Nährmediums (BHI Brühe, supplementiert mit 2 % Saccharose und 2 % Glukose) zurückzuführen [Knobloch *et al.*, 2002a]. Jedoch kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den hier untersuchten *S. aureus* Isolaten aus Endoprotheseninfektionen um Repräsentanten definierter klonaler Linien handelt, die sich hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung von solchen, die vornehmlich bei Septikämien auftreten, unterscheiden [Cassat *et al.*, 2005].

Die Biofilmbildung umfasst zwei entscheidende Phasen: das primäre Attachment und die Akkumulation der Bakterien in mehrschichtigen Zellschichten [Götz, 2002; Mack, 1999; Mack *et al.*, 2006b].

In der Phase des primären Attachments sind Mechanismen, die die Interaktion der Staphylokokken mit der zu besiedelnden Oberfläche begünstigen, von ausschlaggebender Bedeutung. Hierbei ist hervorzuheben, dass implantierte Fremdmaterialien bereits kurz nach ihrer Implantation von extrazellulären Matrixmolekülen wie Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin oder Kollagen bedeckt werden (sogenannte Konditionierung) [Herrmann *et al.*, 1988]. Somit erscheinen solche Mechanismen, die alleine auf physiko-chemischen Phänomenen beruhen, für die Pathogenese von eher untergeordneter Bedeutung zu sein. Vielmehr sind solche Zellwandstrukturen von großer Relevanz, die spezifisch die Interaktion von Staphylokokken mit der konditionierten Oberfläche vermitteln. Solche Zellwandproteine konnten insbesondere bei *S. aureus* in großer Zahl beschrieben werden (zusammengefasst in den Gruppen der MSCRAMM und SERAM Proteine) [Foster and Höök, 1998; Chavakis *et al.*, 2005]. Im Gegensatz dazu konnten im Genom von *S. epidermidis* weit weniger Adhäsine für extrazelluläre Matrixbestandteile gefunden werden [Gill *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2005].

Die Relevanz verschiedener bakterieller Zellwand-assoziiierter Faktoren für die Adhäsion an Matrixbestandteilen des Wirtes ist für viele verschiedene klinische Situationen weithin bekannt und konnte in verschiedenen Tiermodellen unter Verwendung definierter Mutanten demonstriert werden [Götz, 2004; Moreillon *et al.*, 1995]. Die verhältnismäßig hohe Prävalenz spezifischer Adhäsine in *S. aureus* und *S. epidermidis* von Endoprotheseninfektionen nach TKE und THE demonstriert, dass sie für Biofilm-assoziierte Infektionen auch in diesem klinischen Kontext von Bedeutung sind.

Bei *S. aureus* war hierbei die Prävalenz der Gene, welche für das primäre Attachment von Bedeutung sind, ähnlich hoch wie bei *S. aureus* Isolaten anderer Infektionen [Peacock *et al.*,

2002]. Interessanterweise konnte das Gen *cna*, welches für ein Kollagen-bindendes Protein kodiert, nur in 21 % der *S. aureus* Isolate gefunden werden. *Cna* wurde im Kontext muskuloskelettaler Infektionen als Virulenzmarker beschrieben [Cassat *et al.*, 2005;Booth *et al.*, 2001], scheint jedoch bei Endoprotheseninfektionen keine übergeordnete Relevanz zu besitzen. Andererseits konnten die *bone sialoprotein*-bindenden Proteine *bbp* und *sdrE*, alleine oder in Kombination, bei 78 % der *S. aureus* Stämme nachgewiesen werden. *Bbp* und *sdrE* weisen signifikante Sequenzhomologien auf und repräsentieren offensichtlich Allele eines stark divergenten Lokus [Peacock *et al.*, 2002;Cassat *et al.*, 2005;Tung *et al.*, 2000]. Somit besitzt die Mehrzahl der hier untersuchten *S. aureus* Stämme die generelle Fähigkeit zur Bindung an das im Knochen abundante *bone sialoprotein*.

Neben den grundsätzlichen pathogenetischen Aspekten sind die hier erhobenen Befunde auch von großem praktischem Interesse im Hinblick auf die Nutzung präventiver Strategien. So wurde zum Beispiel ein humanisierter, monoklonaler Antikörper gegen ClfA generiert [Patti, 2004], welcher bislang in Phase II klinischer Studien zur Behandlung von *S. aureus* Bakteriämien eingesetzt wurde [Weems, Jr. *et al.*, 2006]. Dieser könnte sich auch zur Prävention oder Therapie Endoprothesen-assoziiertes *S. aureus* Infektionen eignen, da die hier untersuchten Stämme in allen Fällen *clfA*-positiv waren.

In Analogie wurde kürzlich über die Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen das Fibrinogen-bindende *S. epidermidis* Protein Fbe (SdrG) berichtet [Vernachio *et al.*, 2006;Hall *et al.*, 2007]. Für einen dieser Antikörper konnte bereits in einem Kaninchen-Fremdkörperinfektionsmodell eine schützende Wirkung demonstriert werden [Rennermalm *et al.*, 2004]. Somit scheint es möglich, auch bei *S. epidermidis* Faktoren, die am primären Attachment beteiligt sind, für innovative präventive Strategien zu nutzen. Hierbei bietet sich als Zielstruktur nicht nur Fbe, welches in dieser Studie und in unabhängigen Untersuchungen hoch prävalent in invasiven *S. epidermidis* Populationen nachgewiesen wurde, an [Galdbart *et al.*, 2000;Frebourg *et al.*, 2000;Rohde *et al.*, 2004;Rohde *et al.*, 2007]. Auch die weiteren in der ersten Phase der Biofilmbildung beteiligten Proteine AtlE und Embp waren in über 90 % der Fälle nachweisbar. Diese Beobachtung deckt sich mit unabhängigen epidemiologischen Untersuchungen [Vandecasteele *et al.*, 2003a;Rohde *et al.*, 2004;Petrelli *et al.*, 2006;Klug *et al.*, 2003;Frebourg *et al.*, 2000]. Auch AtlE und Embp stellen damit interessante Impfstoffkandidaten dar. Embp könnte hierbei von besonderem Interesse sein, da es starke Homologien mit dem Protein Ebh von *S. aureus* aufweist [Clarke *et al.*, 2002;Williams *et al.*, 2002] und somit eine Embp-basierte Impfung Schutz gegen *S. epidermidis* und *S. aureus* Infektionen bieten könnte.

Mit dem Ziel, geeignete Impfstoffkandidaten zu identifizieren, wurde auch intensiv nach Faktoren, die funktionell an der Biofilmmakkumulation beteiligt sind, gesucht. Hierbei konzentrierte sich die Arbeit vor allem auf die Charakterisierung von Polysacchariden, die in großen Mengen in der von den Bakterien produzierten, extrazellulären Matrix zu finden sind.

Diese Bemühungen führten zur Darstellung des interzellulären Polysaccharid-Adhäsins PIA. PIA wurde durch einen kombinierten genetischen wie auch biochemischen Ansatz von Mack und Mitarbeitern identifiziert und hinsichtlich seiner molekularen Struktur charakterisiert [Mack *et al.*, 1992; Mack *et al.*, 1994b; Mack *et al.*, 1996a]. Durch die Analyse von Transposonmutanten konnte auch der für die Synthese des Polysaccharids verantwortliche Genort (*icaADBC*) identifiziert werden [Heilmann *et al.*, 1996; Mack *et al.*, 2001; Götz, 2002]. PIA fungiert nicht nur als Stabilisator der Biofilmarchitektur, sondern es schützt die im Biofilm organisierten Bakterien auch vor Effektormechanismen der frühen Immunantwort [Vuong *et al.*, 2004b; Vuong *et al.*, 2004a].

In der Folge konnten *icaADBC* Homologe in einer Vielzahl von Mikroorganismen nachgewiesen werden, wobei erstaunlich ist, dass hierunter auch gramnegative Spezies zu finden sind [Wang *et al.*, 2004; Kaplan *et al.*, 2004b; Cramton *et al.*, 1999]. Während bei vielen dieser Spezies die Funktion dieser Homologe jedoch nicht endgültig geklärt ist, konnte bei *S. aureus* durch die Konstruktion einer definierten *icaADBC* knock-out Mutante sowie eine ungerichtete Transposonmutagenese eindeutig eine Beteiligung von *icaADBC* und PIA bei der *S. aureus* Biofilmbildung belegt werden [Cramton *et al.*, 1999; Tu Quoc *et al.*, 2007]. Das durch *icaADBC* kodierte Genprodukte synthetisierte Polysaccharid wurde zunächst aufgrund von unterschiedlichen Befunden in der biochemischen Analyse als Poly-N-Succinyl- β -1,6-Glukosamin (PNSG) bezeichnet [McKenney *et al.*, 1999]. Allerdings konnten diese biochemischen Unterschiede zu PIA von *S. epidermidis* in weiteren Untersuchungen nicht bestätigt werden [Joyce *et al.*, 2003], so dass letztlich davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei dem von *S. epidermidis* und *S. aureus* synthetisierten Polysacchariden um identische Moleküle handelt [Maira-Litran *et al.*, 2002]. Die Beteiligung von PIA an der Biofilmbildung der hier untersuchten *S. aureus* Stämme konnte indirekt durch den Nachweis einer Empfindlichkeit der Biofilme gegenüber der spezifisch PIA-degradierenden β -1,6-Hexosaminidase DspB [Kaplan *et al.*, 2004a] nachgewiesen werden. Generell scheint die PIA-Synthese allerdings keine essentielle Voraussetzung für die Biofilmbildung bei Staphylokokken zu sein. Sowohl für *S. aureus* [Shanks *et al.*, 2005; Fitzpatrick *et al.*, 2005; Toledo-Arana *et al.*, 2005; Beenken *et al.*, 2004; Lasa and Penades, 2006] als auch für *S. epidermidis* [Cramton *et al.*, 1999; Kozitskaya *et al.*, 2004; Hennig *et al.*, 2007; Petrelli *et al.*, 2006] wurde sporadisch von

PIA-unabhängiger Biofilmbildung berichtet. Da zudem die *icaADBC* Expression und die PIA-Synthese, trotz der Organisation in Biofilmen, erst in späteren Phasen der Fremdkörper-assoziierten Infektionen von *S. aureus* stattzufinden scheint, müssen alternative Mechanismen der interzellulären Adhäsion aktiv sein [Fluckiger *et al.*, 2005]. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, wurden sämtliche Biofilme der *S. aureus* Isolate dieser Stammsammlung durch Trypsin desintegriert. Dadurch konnte demonstriert werden, dass, zusätzlich zu PIA, Proteine an der *in vitro* Biofilmmakulation von *S. aureus* beteiligt sind. PIA und Protein-Faktoren scheinen demnach *in vitro* parallel in der Zell-Zell-Adhäsion von *S. aureus* Stämmen aus periprothetischen Infektionen nach TKE und THE zu agieren. Es wurde vorgeschlagen, dass das Biofilm-assoziierte Protein (Bap) als interzelluläres Adhäsion fungieren kann [Cucarella *et al.*, 2001; Lasa and Penades, 2006]. Bap wurde, wie auch in anderen Studien gezeigt [Cucarella *et al.*, 2004; Cucarella *et al.*, 2001], bei keinem der hier untersuchten Stämme gefunden. Vielmehr scheint es an der Pathogenese der Mastitis bei Rindern beteiligt zu sein, die jedoch nicht durch humanpathogene *S. aureus* Stämme hervorgerufen wird [Cucarella *et al.*, 2001]. Demnach müssen andere Proteinstrukturen an der *S. aureus* Biofilmbildung beteiligt sein. Zukünftige Studien sollten sich aus diesem Grund auf deren Identifikation fokussieren. Einige *S. aureus* Stämme tragen das Gen *sasG*, welches für ein Zellwand-assoziiertes Protein kodiert. SasG weist signifikante Homologien mit dem interzellulären Adhäsion Aap von *S. epidermidis* auf [Rohde *et al.*, 2005; Roche *et al.*, 2003b]. Tatsächlich konnte kürzlich gezeigt werden, dass SasG mit einem Aap analogen Mechanismus, PIA-unabhängig Biofilmbildung bei *S. aureus* vermitteln kann [Corrigan *et al.*, 2007]. Das Biofilm-assoziierte Protein Bap, welchem eine Protein vermittelte interzelluläre Adhäsion suggeriert wurde [Cucarella *et al.*, 2001], war in keinem der untersuchten *S. aureus* Isolate dieser Stammsammlung zu finden. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen anderer Arbeiten [Cucarella *et al.*, 2001] lässt dieses Ergebnis an der Funktion Bap's in humanen Staphylokokken-Infektionen zweifeln.

Im Gegensatz zu den *S. aureus* Stämmen stellt die PIA-abhängige Biofilmbildung der *S. epidermidis* Isolate keine essentielle Voraussetzung für ihre Virulenz in periprothetischen Infektionen dar. Der die PIA-Synthese kodierende *icaADBC*-Lokus war nämlich bei nur 50 % der *S. epidermidis* Isolate dieser Stammsammlung zu finden. Eine ähnlich niedrige *icaADBC* Prävalenz (55 %), verglichen mit Blutkultur-Isolaten, die in 76 % bis 93 % *icaADBC* positiv waren [Ziebuhr *et al.*, 1997; Rohde *et al.*, 2004; Frebourg *et al.*, 2000], wurde ebenfalls in einer anderen Studie über *S. epidermidis* Isolate aus Endoprotheseninfektionen beschrieben [Frank *et al.*, 2004; Arciola *et al.*, 2003]. Trotz der relativ kleinen in dieser Arbeit untersuchten Popu-

lation weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass PIA-vermittelte Biofilmbildung für verschiedene klinische Schauplätze möglicherweise von unterschiedlicher Bedeutung ist.

Interessanterweise waren 28 % der hier untersuchten biofilmpositiven *S. epidermidis* Stämme *icaADBC*-negativ und etablierten Protease-sensitive Biofilme, was darauf hindeutet, dass Proteinfaktoren für die Biofilmbildung bei *S. epidermidis* Isolaten im Rahmen periprothetischer Infektionen ausreichen. Dass Bedingungen der interzellulären Adhäsion Infektions-spezifisch variieren, wurde durch den Misserfolg, reduzierte Virulenz bei der *icaADBC*-Mutante *S. epidermidis* 1457-M10 in einem Meerschweinchen Infektionsmodell zu detektieren [Francois *et al.*, 2003], bestätigt. Der gleiche Mutant zeigte nämlich sowohl in einem Maus-Fremdkörper-Infektionsmodell [Rupp *et al.*, 1999a] als auch in einem Katheter-assoziierten Ratten-Infektionsmodell [Rupp *et al.*, 1999b] eine beeinträchtigte Virulenz. Dass bereits minimale Umweltunterschiede *in vivo* Einfluss auf die interzellulären Adhäsionsmechanismen nehmen, wird auch durch die differente Verteilung von *icaADBC* und der PIA-abhängigen Biofilmbildung in den aus Endoprotheseninfektionen nach TKE und THE isolierten *S. epidermidis* Stämmen dieser Sammlung widergespiegelt. *S. epidermidis* Stämme von periprothetischen Infektionen nach TKE waren größtenteils (73 %) *icaADBC*- und PIA-positiv, während 64 % der *S. epidermidis* Stämme von periprothetischen Infektionen nach THE *icaADBC*-negativ waren. Dieser Unterschied könnte beispielsweise aus unterschiedlichem biomechanischem Stress in den endoprothetisch versorgten Gelenken und dadurch veränderten Selektionsbedingungen resultieren. Ein Teil der *icaADBC*-negativen *S. epidermidis* Isolate von periprothetischen Infektionen nach THE produzierte auf eine PIA-unabhängige Art und Weise Biofilme. Interessanterweise waren die PIA-unabhängig etablierten Biofilme von signifikant schwächerer Quantität als die PIA-abhängigen Biofilme.

6.2 Protein-vermittelte Biofilmbildung bei *S. epidermidis*

Das Zellwand-assoziierte Protein Aap vermittelt interzelluläre Adhäsion und Biofilmbildung in *S. epidermidis* auf eine vollständig PIA- und Polysaccharid-unabhängige Art und Weise [Mack *et al.*, 2006b]. Aap ist das erste *S. epidermidis* Zellwand-assoziierte Proteine, für welches eine eindeutig PIA-unabhängige interzellulär adhäsive Funktion beschrieben werden konnte [Rohde *et al.*, 2005]. Aap wurde im Rahmen einer Mitomycin-C-Mutagenese des PIA-positiven *S. epidermidis* Stamms RP62A erstmals identifiziert [Hussain *et al.*, 1997]. Die resultierende Mutante M7 zeigte einen biofilmmnegativen Phänotyp, welcher mit dem Verlust von Zellwand-gebundenem Aap in Verbindung gebracht wurde. Da die Mutante M7 PIA

nicht mehr an der Zelloberfläche bindet, sondern in den Überstand abgibt, wurde spekuliert, ob es sich bei Aap um den PIA-Rezeptor auf der Bakterienzelloberfläche handeln könnte. In dieser Funktion wäre Aap somit nur indirekt an der *S. epidermidis* Biofilmbildung beteiligt. Durch Untersuchung des biofilmpositiven *S. epidermidis* Stamms 5179-R1 konnte jedoch gezeigt werden, dass Aap in völlig PIA-unabhängiger Form interzelluläre Adhäsion und Biofilmbildung vermitteln kann [Rohde *et al.*, 2005]. Aap ist ein etwa 220 kDa großes, kovalent an die Zellwand gebundenes Protein, welches in Form fibrillärer Strukturen auf der Oberfläche von *S. epidermidis* angeordnet ist [Banner *et al.*, 2007]. Aap ist aus zwei wesentlichen Domänen aufgebaut. Die Domäne-A weist keine strukturellen Besonderheiten auf, auch lassen sich keine Homologien mit Proteinen bekannter Funktion finden. Im Gegensatz dazu ist die Domäne B aus repetitiv angeordneten, 128 Aminosäuren langen *repeats* aufgebaut. Die repetitive Domäne-B ist Träger der interzellulär adhäsiven Funktion von Aap [Rohde *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2005].

Aap konnte bei 80 % der hier untersuchten *S. epidermidis* Stämme nachgewiesen werden. Auch in anderen Stammsammlungen konnte *aap* in ähnlich hoher Prävalenz gefunden werden [Rohde *et al.*, 2004; Vandecasteele *et al.*, 2003a; Petrelli *et al.*, 2006; de Araujo *et al.*, 2006]. Diese epidemiologischen Daten legen die Vermutung nahe, dass Aap eine wichtige Rolle generell und vor allem bei der PIA-unabhängigen Biofilmbildung spielen könnte. Tatsächlich konnte bereits gezeigt werden, dass Aap-spezifische Antikörper die Biofilmbildung inhibieren können, wodurch ein funktioneller Zusammenhang zwischen Aap Expression und Biofilmbildung aufgezeigt wird [Hussain *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2005; Rohde *et al.*, 2005]. Um die funktionelle Beteiligung von Aap bei der Biofilmbildung der PIA-negativen Stämme zu demonstrieren, wurden Biofilminhibitionsstudien unter Verwendung eines anti-Domäne-B-spezifischen Antiserums [Rohde *et al.*, 2007] durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Biofilmbildung durch das spezifische Antiserum in allen *aap*-positiven, *icaADBC*-negativen *S. epidermidis* Stämmen inhibiert werden konnte. Auf diese Weise konnte eine direkte funktionelle Beteiligung von Aap für eine PIA-unabhängige Biofilmbildung in diesen Isolaten demonstriert werden. Auf die Biofilmbildung von PIA-produzierenden *S. epidermidis* Stämmen hatte das Aap-Domäne-B-spezifische Antiserum keinen Einfluss. Diese Beobachtungen veranschaulichen einerseits die Tatsache, dass interzelluläre Adhäsion bei *S. epidermidis* nicht nur als multifaktorieller Prozess zu betrachten ist, sondern demonstrieren andererseits, dass die involvierten Faktoren redundant organisiert sind und sich potentiell funktionell ersetzen können.

Die Bedeutung von Aap für die Biofilmbildung im Kontext periprothetischer Infektionen konnte durch die Tatsache, dass durch proteolytische Vorbehandlung mit Trypsin in 3 *icaADBC*-negativen und biofilmmnegativen, aber *aap*-positiven *S. epidermidis* Isolaten dieser Stammsammlung ein biofilmpositiver Phänotyp induziert werden konnte [Rohde *et al.*, 2005], weiter bekräftigt werden. In dieser Arbeit untersuchte *S. epidermidis* Stämme bildeten in mindestens 13 % (4 von 30) einen Aap-abhängigen Biofilm. Außerdem könnte eine Aap-abhängige Biofilmbildung bei *in vitro* biofilmmnegativen *S. epidermidis* Stämmen möglicherweise für die Expression eines biofilmpositiven Phänotyps *in vivo* bedeutend sein. In dieser Beziehung könnte ebenfalls Bhp, ein *bap*-Homolog, das in die Biofilmbildung von *S. epidermidis* involviert sein soll [Cucarella *et al.*, 2001], von Interesse sein. *Bhp* war allerdings in nur 27 % der *S. epidermidis* Isolate von Endoprotheseninfektionen nach TKE und THE vorhanden.

6.2.1 Polymorphismus der repetitiven Aap Domäne-B bei *S. epidermidis*

Die repetitive Domäne-B von Aap ist aufgrund einer variablen Anzahl von *repeats* durch einen Längenpolymorphismus gekennzeichnet, durch welchen einzelne Stämme unterschieden werden können [Rohde *et al.*, 2004]. In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch die Bestimmung der *repeat*-Zahl eine Klon-spezifische Genotypisierung vorgenommen werden kann [Monk and Archer, 2007]. Marker, die zur Diskriminierung spezifischer Klone verwendet werden, sind idealer Weise durch eine hohe Variabilität zwischen unabhängigen Stämmen gekennzeichnet, verändern sich aber im Bezug auf einen Stamm nur langsam [Tenover *et al.*, 1995]. Aus diesem Grunde weisen die hier erhobenen Ergebnisse darauf hin, dass diese Kriterien bei Aap nur bedingt erfüllt werden. Im Verlauf einzelner Infektionen kam es zu Änderungen der *repeat*-Anzahl, so dass nur durch ihre Bestimmung keine eindeutige klonale Charakterisierung möglich ist.

Der molekulare Mechanismus, der dieser Variabilität zugrunde liegt, ist hier nicht eindeutig zu benennen. Von anderen ähnlich strukturierten bakteriellen Proteinen ist aber bekannt, dass hierfür homologe Rekombinationsereignisse oder die Ausbildung von Haarnadelschleifen von Bedeutung sein können [Madoff *et al.*, 1996]

Die funktionellen Auswirkungen der strukturellen Änderung von Domäne-B bleiben unklar. Bezüglich der variierenden *repeats* konnte kein systematischer Einfluss auf die Fähigkeit der Biofilmbildung entsprechender Stämme beobachtet werden. Somit scheint die beobachtete Variabilität keine Auswirkung auf die in der Domäne-B lokalisierten adhäsiven Eigenschaften von Aap zu haben. Dies führt zu der Frage, wodurch Subpopulationen mit veränderten *repeat*-

Zahlen *in vivo* selektioniert werden. Da die *in vitro* Passage in *S. epidermidis* 5179 zu keinen variierenden *repeats* führte [Rohde *et al.*, 2005], sind möglicherweise Interaktionen mit dem Wirt eine treibende Kraft für die natürliche Selektion. Analog zum Effekt der *repeat*-Zahl-Alterationen im Alpha C Protein von Gruppe B Streptokokken [Madoff *et al.*, 1996] könnte die Antigenvariation der Domäne-B einen potentiellen *immun-escape* Mechanismus repräsentieren.

6.2.2 Prävalenz Virulenz-assoziiierter Gene in *S. epidermidis* unabhängigen KNS-Spezies

Auch *S. epidermidis* unabhängige KNS-Spezies spielen im Zusammenhang mit Endoprotheseninfektionen eine Rolle [Nilsson-Augustinsson *et al.*, 2007; Frank *et al.*, 2004; Allignet *et al.*, 1999]. Hierbei ist vor allem *S. caprae* als bedeutender Erreger beschrieben worden. Auch konnte für diese Spezies gezeigt werden, dass die bereits bei *S. epidermidis* bekannten Virulenzfaktoren AtIE und PIA bei der Pathogenese einer Fremdmaterial-assoziierten Infektion von Bedeutung sind [Allignet *et al.*, 1999]. In der Folge konnte vor allem der *icaADBC* Lokus bei einer Reihe weiterer KNS-Spezies identifiziert werden [Nilsson-Augustinsson *et al.*, 2007; Moretto *et al.*, 2003]. In der hier untersuchten Population war *icaADBC* in 6 von 10 KNS Spezies nachweisbar. Es muss hierbei jedoch betont werden, dass Primer spezifisch für *icaADBC* von *S. epidermidis* verwendet wurden. Da der *icaADBC*-Lokus eine nicht unerhebliche Interspeziesdiversität zeigt, kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass die untersuchten Stämme trotz der negativen PCR ein *icaADBC* Homolog tragen [Rohde *et al.*, 2001a]. Gleiches gilt auch für alle weiteren untersuchten Gene. Außer bei *IS256*, *IS257* und *mecA*, die in der Regel auch über Speziesgrenzen hinweg konserviert vorliegen, kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass Homologe zu den weiteren untersuchten Genen grundsätzlich auch in *S. epidermidis* unabhängigen KNS-Spezies vorkommen. Diese Frage sollte unter Verwendung von Southern-Hybridisierungen unter wenig stringenten Bedingungen in größeren Stammsammlungen untersucht werden. So erhobene Erkenntnisse können Aufschluss über die genetische Grundlage der Biofilmbildung bei *S. epidermidis* unabhängigen KNS liefern.

7 Zusammenfassung

Mit dem Ziel, neue Ansätze für die Diagnostik, Therapie und Prophylaxe zu identifizieren, konnten in den vergangenen Jahren eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren, die an der Pathogenese Fremdmaterial-assoziiertes Staphylokokken-Infektionen beteiligt sind, dargestellt werden. Hierbei ist jedoch die Frage unbeantwortet, welche dieser Faktoren in definierten klinischen Situationen von den Erregern genutzt werden. Um diese für alle weiteren Überlegungen, insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung neuer Impfstoffe, grundlegende Frage zu beantworten, sind detaillierte Untersuchungen an Sammlungen klinisch signifikanter Staphylokokken unabdingbar. In dieser Arbeit konnte in Kooperation mit der ENDO-Klinik Hamburg eine Sammlung klinisch relevanter, genetisch unabhängiger Staphylokokkenisolate aus Endoprothesen-assoziierten Infektionen aufgebaut werden. Die phänotypische Untersuchung dieser Isolate zeigte, dass Biofilmbildung in diesem klinischen Kontext ein wichtiges Merkmal ist. Im Gegensatz zu Ergebnissen früherer Untersuchungen scheinen für die Ausprägung dieses Phänotyps jedoch nicht nur das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsin PIA, sondern auch Proteinfaktoren eine entscheidende Rolle zu spielen. Die hier gezeigten phänotypische Untersuchungen sowie auch die Verteilung Virulenz-assoziiertes Gene weisen darauf hin, dass *S. aureus* parallel sowohl Protein- wie auch Polysaccharid-basierte Mechanismen der interzellulären Adhäsion nutzt. Im Gegensatz dazu finden sich bei *S. epidermidis* Stämme, die entweder Polysaccharid- oder aber Protein-abhängig Biofilme etablieren können. Hierbei fanden sich Hinweise, dass *S. epidermidis* diese unterschiedlichen Mechanismen in Abhängigkeit von der Infektionslokalisation nutzt. In der Gruppe der Protein-abhängig Biofilmbildenden *S. epidermidis* Stämme ist das *Accumulation associated Protein* Aap funktionell am Prozess der Biofilmmakkumulation beteiligt. Das korrespondierende Gen *aap* konnte bei 80 % der *S. epidermidis* Isolate gefunden werden, so dass dieses Protein offensichtlich von übergeordneter Bedeutung ist. Allerdings scheinen auch Aap-unabhängige Proteine an der Biofilmbildung beteiligt zu sein.

Die bedeutende Rolle von Proteinfaktoren in der Biofilmbildung von Staphylokokken wirft ein neues Licht auf die Pathogenese Fremdkörper-assoziiertes Knocheninfektionen und macht zukünftige Studien notwendig, welche diesen Sachverhalt in größeren Populationen untersuchen. Angesichts der Versuche, PIA als Impfstoff zu verwenden, hat die unterschiedliche Relevanz funktionell aktiver Moleküle bedeutende Auswirkungen auf die zukünftige Entwick-

lung präventiver Strategien, da bakterielle Oberflächenproteine interessante Moleküle als Basis eines Konjugatimpfstoffs darstellen.

8 Literaturverzeichnis

Alexander, W., and Rimland, D. (1987) Lack of correlation of slime production with pathogenicity in continuous ambulatory peritoneal dialysis peritonitis caused by coagulase negative staphylococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* **8**: 215-220.

Allignet, J., Aubert, S., Dyke, K.G., and El Solh, N. (2001) *Staphylococcus caprae* strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin-binding fibronectin and the *ica* operon involved in biofilm formation. *Infect Immun* **69**: 712-718.

Allignet, J., Galdbart, J.O., Morvan, A., Dyke, K.G., Vaudaux, P., Aubert, S. et al. (1999) Tracking adhesion factors in *Staphylococcus caprae* strains responsible for human bone infections following implantation of orthopaedic material. *Microbiology* **145** (Pt 8): 2033-2042.

Anderson J., and Marchant R. (2000) Biomaterials: Factors Favoring Colonization and Infection. In Infections associated with indwelling medical devices. Waldvogel F., and Bisno H. (eds). ASM Press, pp. 173-209.

Arciola, C.R., Campoccia, D., Gamberini, S., Donati, M.E., Baldassarri, L., and Montanaro, L. (2003) Occurrence of *ica* genes for slime synthesis in a collection of *Staphylococcus epidermidis* strains from orthopedic prosthesis infections. *Acta Orthop Scand* **74**: 617-621.

Baddour, L.M., Smalley, D.L., Kraus, A.P., Jr., Lamoreaux, W.J., and Christensen, G.D. (1986) Comparison of microbiologic characteristics of pathogenic and saprophytic coagulase-negative staphylococci from patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* **5**: 197-205.

Bailey, E.M., Constance, T.D., Albrecht, L.M., and Rybak, M.J. (1990) Coagulase-negative staphylococci: incidence, pathogenicity, and treatment in the 1990s. *DICP* **24**: 714-720.

Ballard, J.L., Bunt, T.J., and Malone, J.M. (1992) Major complications of angioaccess surgery. *Am J Surg* **164**: 229-232.

Bandyk, D.F., and Esses, G.E. (1994) Prosthetic graft infection. *Surg Clin North Am* **74**: 571-590.

Banerjee, S.N., Emori, T.G., Culver, D.H., Gaynes, R.P., Jarvis, W.R., Horan, T. et al. (1991) Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am J Med* **91**: 86S-89S.

- Banner,M.A., Cunniffe,J.G., Macintosh,R.L., Foster,T.J., Rohde,H., Mack,D. et al.** (2007) Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein. *J Bacteriol* **189**: 2793-2804.
- Bateman,A., Holden,M.T., and Yeats,C.** (2005) The G5 domain: a potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation. *Bioinformatics* **21**: 1301-1303.
- Beard-Pegler,M.A., Gabelish,C.L., Stubbs,E., Harbour,C., Robson,J., Falk,M. et al.** (1989) Prevalence of peritonitis-associated coagulase-negative staphylococci on the skin of continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Epidemiol Infect* **102**: 365-378.
- Beenken,K.E., Dunman,P.M., McAleese,F., Macapagal,D., Murphy,E., Projan,S.J. et al.** (2004) Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* **186**: 4665-4684.
- Booth,M.C., Pence,L.M., Mahasreshti,P., Callegan,M.C., and Gilmore,M.S.** (2001) Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. *Infect Immun* **69**: 345-352.
- Bowden,M.G., Visai,L., Longshaw,C.M., Holland,K.T., Speziale,P., and Hook,M.** (2002) Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen binding adhesin? *J Biol Chem* **277**: 43017-43023.
- Cassat,J.E., Dunman,P.M., McAleese,F., Murphy,E., Projan,S.J., and Smeltzer,M.S.** (2005) Comparative Genomics of *Staphylococcus aureus* Musculoskeletal Isolates. *J Bacteriol* **187**: 576-592.
- Chavakis,T., Hussain,M., Kanse,S.M., Peters,G., Bretzel,R.G., Flock,J.I. et al.** (2002) *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med* **8**: 687-693.
- Chavakis,T., Wiechmann,K., Preissner,K.T., and Herrmann,M.** (2005) *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost* **94**: 278-285.
- Christensen,G.D., Parisi,J.T., Bisno,A.L., Simpson,W.A., and Beachey,E.H.** (1983) Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* **18**: 258-269.
- Christensen,G.D., Simpson,W.A., Bisno,A.L., and Beachey,E.H.** (1982) Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* **37**: 318-326.

- Christensen,G.D., Simpson,W.A., Younger,J.J., Baddour,L.M., Barrett,F.F., Melton,D.M., and Beachey,E.H.** (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* **22**: 996-1006.
- Chugh,T.D., Burns,G.J., Shuhaiber,H.J., and Bahr,G.M.** (1990) Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to fibrin-platelet clots in vitro mediated by lipoteichoic acid. *Infect Immun* **58**: 315-319.
- Clarke,S.R., Harris,L.G., Richards,R.G., and Foster,S.J.** (2002) Analysis of Ehb, a 1.1-megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **70**: 6680-6687.
- Cochrane,D.M., Brown,M.R., Anwar,H., Weller,P.H., Lam,K., and Costerton,J.W.** (1988) Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* surface protein antigens in a rat model of chronic lung infection. *J Med Microbiol* **27**: 255-261.
- Conlon,K.M., Humphreys,H., and O'Gara,J.P.** (2002) *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **184**: 4400-4408.
- Corrigan,R.M., Rigby,D., Handley,P., and Foster,T.J.** (2007) The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology* **153**: 2435-2446.
- Costerton,J.W., Stewart,P.S., and Greenberg,E.P.** (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- Costerton,W., Veeh,R., Shirtliff,M., Pasmore,M., Post,C., and Ehrlich,G.** (2003) The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* **112**: 1466-1477.
- Cramton,S.E., Gerke,C., Schnell,N.F., Nichols,W.W., and Götz,F.** (1999) The Intercellular Adhesion (*ica*) Locus Is Present in *Staphylococcus aureus* and Is Required for Biofilm Formation. *Infect Immun* **67**: 5427-5433.
- Cucarella,C., Solano,C., Valle,J., Amorena,B., Lasa,I., I, and Penades,J.R.** (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. *J Bacteriol* **183**: 2888-2896.
- Cucarella,C., Tormo,M.A., Ubeda,C., Trottonda,M.P., Monzon,M., Peris,C. et al.** (2004) Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **72**: 2177-2185.
- Cuckler,J.M., Star,A.M., Alavi,A., and Noto,R.B.** (1991) Diagnosis and management of the infected total joint arthroplasty. *Orthop Clin North Am* **22**: 523-530.

- Darouiche,R.O.** (2004) Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med* **350**: 1422-1429.
- Davenport,D.S., Massanari,R.M., Pfaller,M.A., Bale,M.J., Streed,S.A., and Hierholzer,W.J., Jr.** (1986) Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis* **153**: 332-339.
- de Araujo,G.L., Coelho,L.R., de Carvalho,C.B., Maciel,R.M., Coronado,A.Z., Rozenbaum,R. et al.** (2006) Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. *J Antimicrob Chemother* **57**: 855-864.
- de Silva,G.D., Kantzanou,M., Justice,A., Massey,R.C., Wilkinson,A.R., Day,N.P., and Peacock,S.J.** (2002) The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative Staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* **40**: 382-388.
- Deighton,M.A., and Balkau,B.** (1990) Adherence measured by microtiter assay as a virulence marker for *Staphylococcus epidermidis* infections. *J Clin Microbiol* **28**: 2442-2447.
- Devriese,L.A., Vancanneyt,M., Baele,M., Vanechoutte,M., De,G.E., Snauwaert,C. et al.** (2005) *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 1569-1573.
- Diaz-Mitoma,F., Harding,G.K., Hoban,D.J., Roberts,R.S., and Low,D.E.** (1987) Clinical significance of a test for slime production in ventriculoperitoneal shunt infections caused by coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis* **156**: 555-560.
- Downer,R., Roche,F., Park,P.W., Mecham,R.P., and Foster,T.J.** (2002) The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. *J Biol Chem* **277**: 243-250.
- Dunne,W.M., Jr., Nelson,D.B., and Chusid,M.J.** (1987) Epidemiologic markers of pediatric infections caused by coagulase-negative staphylococci. *Pediatr Infect Dis J* **6**: 1031-1035.
- Espersen,F., Wurr,M., Corneliussen,L., Hog,A.L., Rosdahl,V.T., Frimodt-Moller,N., and Skinhoj,P.** (1994) Attachment of staphylococci to different plastic tubes in vitro. *J Med Microbiol* **40**: 37-42.
- Fang,G., Keys,T.F., Gentry,L.O., Harris,A.A., Rivera,N., Getz,K. et al.** (1993) Prosthetic valve endocarditis resulting from nosocomial bacteremia. A prospective, multicenter study. *Ann Intern Med* **119**: 560-567.
- Fidalgo,S., Vazquez,F., Mendoza,M.C., Perez,F., and Mendez,F.J.** (1990) Bacteremia due to *Staphylococcus epidermidis*: microbiologic, epidemiologic, clinical, and prognostic features. *Rev Infect Dis* **12**: 520-528.

- Fitzpatrick,F., Humphreys,H., and O'Gara,J.P.** (2005) Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol* **43**: 1973-1976.
- Fluckiger,U., Ulrich,M., Steinhuber,A., Doring,G., Mack,D., Landmann,R. et al.** (2005) Biofilm formation, *icaADBC* transcription, and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by staphylococci in a device-related infection model. *Infect Immun* **73**: 1811-1819.
- Foster,T.J.** (2005) Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* **3**: 948-958.
- Foster,T.J., and Höök,M.** (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* **6**: 484-488.
- Fowler,V.G., Jr., Fey,P.D., Reller,L.B., Chamis,A.L., Corey,G.R., and Rupp,M.E.** (2001) The intercellular adhesin locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **189**: 127-131.
- Francois,P., Tu Quoc,P.H., Bisognano,C., Kelley,W.L., Lew,D.P., Schrenzel,J. et al.** (2003) Lack of biofilm contribution to bacterial colonisation in an experimental model of foreign body infection by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**: 135-140.
- Frank,K.L., Hanssen,A.D., and Patel,R.** (2004) *icaA* is not a useful diagnostic marker for prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol* **42**: 4846-4849.
- Frebourg,N.B., Lefebvre,S., Baert,S., and Lemeland,J.F.** (2000) PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J Clin Microbiol* **38**: 877-880.
- Galdbart,J.O., Allignet,J., Tung,H.S., Ryden,C., and El Solh,N.** (2000) Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *J Infect Dis* **182**: 351-355.
- Galdbart,J.O., Morvan,A., Desplaces,N., and el Solh,N.** (1999) Phenotypic and genomic variation among *Staphylococcus epidermidis* strains infecting joint prostheses. *J Clin Microbiol* **37**: 1306-1312.
- Geipel,U., and Herrmann,M.** (2005) [The infected implant: bacteriology]. *Unfallchirurg* **108**: 961-975.
- Gerke,C., Kraft,A., Süßmuth,R., Schweitzer,O., and Götz,F.** (1998) Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem* **273**: 18586-18593.

- Gill,S.R., Fouts,D.E., Archer,G.L., Mongodin,E.F., Deboy,R.T., Ravel,J. et al.** (2005) Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol* **187**: 2426-2438.
- Götz,F.** (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* **43**: 1367-1378.
- Götz,F.** (2004) Staphylococci in colonization and disease: prospective targets for drugs and vaccines. *Curr Opin Microbiol* **7**: 477-487.
- Gotz,F., Heilmann,C., and Cramton,S.E.** (2000) Molecular basis of catheter associated infections by staphylococci. *Adv Exp Med Biol* **485**: 103-111.
- Grosserode,M.H., and Wenzel,R.P.** (1991) The continuing importance of staphylococci as major hospital pathogens. *J Hosp Infect* **19 Suppl B**: 3-17.
- Hall,A.E., Patel,P.R., Domanski,P.J., Prater,B.D., Gorovits,E.L., Syribeys,P.J. et al.** (2007) A panel of monoclonal antibodies recognizing the *Staphylococcus epidermidis* fibrinogen-binding MSCRAMM SdrG. *Hybridoma (Larchmt)* **26**: 28-34.
- Hanssen,A.D., and Rand,J.A.** (1999) Evaluation and treatment of infection at the site of a total hip or knee arthroplasty. *Instr Course Lect* **48**: 111-122.
- Hartford,O., O'Brien,L., Schofield,K., Wells,J., and Foster,T.J.** (2001) The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. *Microbiology* **147**: 2545-2552.
- Heilmann,C., Schweitzer,O., Gerke,C., Vanittanakom,N., Mack,D., and Götz,F.** (1996) Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* **20**: 1083-1091.
- Heilmann,C., Thumm,G., Chhatwal,G.S., Hartleib,J., Uekotter,A., and Peters,G.** (2003) Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **149**: 2769-2778.
- Heinzelmann,M., Herzig,D.O., Swain,B., Mercer-Jones,M.A., Bergamini,T.M., and Polk,H.C., Jr.** (1997) Phagocytosis and oxidative-burst response of planktonic *Staphylococcus epidermidis* RP62A and its non-slime-producing variant in human neutrophils. *Clin Diagn Lab Immunol* **4**: 705-710.
- Hennig,S., Nyunt,W.S., and Ziebuhr,W.** (2007) Spontaneous switch to PIA-independent biofilm formation in an *ica*-positive *Staphylococcus epidermidis* isolate. *Int J Med Microbiol* **297**: 117-122.
- Herrmann,M., Vaudaux,P.E., Pittet,D., Auckenthaler,R., Lew,P.D., Schumacher-Perdreau,F. et al.** (1988) Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis* **158**: 693-701.

- Herwaldt,L.A., Geiss,M., Kao,C., and Pfaller,M.A.** (1996) The positive predictive value of isolating coagulase-negative staphylococci from blood cultures. *Clin Infect Dis* **22**: 14-20.
- Horstkotte,M.A., Knobloch,J.K., Rohde,H., Dobinsky,S., and Mack,D.** (2004) Evaluation of the BD PHOENIX automated microbiology system for detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* **42**: 5041-5046.
- Horstkotte,M.A., Knobloch,J.K., Rohde,H., Dobinsky,S., and Mack,D.** (2002) Rapid Detection of Methicillin Resistance in Coagulase-Negative Staphylococci with the VITEK 2 System. *J Clin Microbiol* **40**: 3291-3295.
- Hussain,M., Heilmann,C., Peters,G., and Herrmann,M.** (2001) Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. *Microb Pathog* **31**: 261-270.
- Hussain,M., Herrmann,M., von Eiff,C., Perdreau-Remington,F., and Peters,G.** (1997) A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun* **65**: 519-524.
- Ince,A., Rupp,J., Frommelt,L., Katzer,A., Gille,J., and Lohr,J.F.** (2004) Is "aseptic" loosening of the prosthetic cup after total hip replacement due to nonculturable bacterial pathogens in patients with low-grade infection? *Clin Infect Dis* **39**: 1599-1603.
- Ishak,M.A., Groschel,D.H., Mandell,G.L., and Wenzel,R.P.** (1985) Association of slime with pathogenicity of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial septicemia. *J Clin Microbiol* **22**: 1025-1029.
- Josefsson,E., McCrea,K.W., Ni,E.D., O'Connell,D., Cox,J., Höök,M., and Foster,T.J.** (1998) Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **144** (Pt 12): 3387-3395.
- Joyce,J.G., Abeygunawardana,C., Xu,Q., Cook,J.C., Hepler,R., Przysiecki,C.T. et al.** (2003) Isolation, structural characterization, and immunological evaluation of a high-molecular-weight exopolysaccharide from *Staphylococcus aureus*. *Carbohydr Res* **338**: 903-922.
- Kaplan,J.B., Raguath,C., Velliyagounder,K., Fine,D.H., and Ramasubbu,N.** (2004a) Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2633-2636.
- Kaplan,J.B., Velliyagounder,K., Raguath,C., Rohde,H., Mack,D., Knobloch,J.K., and Ramasubbu,N.** (2004b) Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J Bacteriol* **186**: 8213-8220.
- Kirchhoff,L.V., and Sheagren,J.N.** (1985) Epidemiology and clinical significance of blood cultures positive for coagulase-negative staphylococcus. *Infect Control* **6**: 479-486.

- Kleeman, K.T., Bannerman, T.L., and Kloos, W.E.** (1993) Species distribution of coagulase-negative staphylococcal isolates at a community hospital and implications for selection of staphylococcal identification procedures. *J Clin Microbiol* **31**: 1318-1321.
- Kloos, W.E.** (1997) Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. In *The staphylococci in human disease*. Crossley, K.B., and Archer, G.L. (eds). New York: Churchill Livingstone, pp. 113-137.
- Kloos, W.E., Ballard, D.N., Webster, J.A., Hubner, R.J., Tomasz, A., Couto, I. et al.** (1997) Ribotype delineation and description of *Staphylococcus sciuri* subspecies and their potential as reservoirs of methicillin resistance and staphylolytic enzyme genes. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 313-323.
- Kloos, W.E., and Bannerman, T.L.** (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* **7**: 117-140.
- Kloos, W.E., George, C.G., Olgiate, J.S., Van, P.L., McKinnon, M.L., Zimmer, B.L. et al.** (1998) *Staphylococcus hominis* subsp. novobiosepticus subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 3**: 799-812.
- Klug, D., Wallet, F., Kacet, S., and Courcol, R.J.** (2003) Involvement of adherence and adhesion *Staphylococcus epidermidis* genes in pacemaker lead-associated infections. *J Clin Microbiol* **41**: 3348-3350.
- Knobloch, J.K., Horstkotte, M.A., Rohde, H., and Mack, D.** (2002a) Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **191**: 101-106.
- Knobloch, J.K., Von Osten, H., Horstkotte, M.A., Rohde, H., and Mack, D.** (2002b) Minimal attachment killing (MAK): a versatile method for susceptibility testing of attached biofilm-positive and -negative *Staphylococcus epidermidis*. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **191**: 107-114.
- Kozitskaya, S., Cho, S.H., Dietrich, K., Marre, R., Naber, K., and Ziebuhr, W.** (2004) The bacterial insertion sequence element *IS256* occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infect Immun* **72**: 1210-1215.
- Lambert, L.H., Cox, T., Mitchell, K., Rossello-Mora, R.A., Del, C.C., Dodge, D.E. et al.** (1998) *Staphylococcus succinus* sp. nov., isolated from Dominican amber. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 2**: 511-518.
- Lasa, I., and Penades, J.R.** (2006) Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* **157**: 99-107.

- Lentino, J.R.** (2003) Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin Infect Dis* **36**: 1157-1161.
- Lidgren, L., Knutson, K., and Stefansdottir, A.** (2003) Infection and arthritis. Infection of prosthetic joints. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **17**: 209-218.
- Mack, D.** (1999) Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *J Hosp Infect* **43 (Suppl)**: S113-S125.
- Mack, D., Bartscht, K., Dobinsky, S., Horstkotte, M.A., Kiel, K., Knobloch, J.K.M., and Schäfer, P.** (2000) Staphylococcal factors involved in adhesion and biofilm formation on biomaterials. In Handbook for studying bacterial adhesion: Principles, methods, and applications. An, Y.H., and Friedman, R.J. (eds). Totowa, N.J.: Humana Press, pp. 307-330.
- Mack, D., Bartscht, K., Fischer, C., Rohde, H., de Grahl, C., Dobinsky, S. et al.** (2001) Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *Meth Enzymol* **336**: 215-239.
- Mack, D., Becker, P., Chatterjee, I., Knobloch, J.K.M., Peters, G., Rohde, H., and Herrmann, M.** (2004) Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *International Journal of Medical Microbiology* **294**: 203-212.
- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., and Laufs, R.** (1996a) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* **178**: 175-183.
- Mack, D., Haeder, M., Siemssen, N., and Laufs, R.** (1996b) Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *J Infect Dis* **174**: 881-884.
- Mack, D., Horstkotte, M.A., Rohde, H., and Knobloch, J.K.M.** (2006a) Coagulase-Negative *Staphylococci*. In Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy. Pace, J.L., Rupp, M.E., and Finch, R.G. (eds). Boca Raton: CRC Press, pp. 109-153.
- Mack, D., Nedelmann, M., Krokotsch, A., Schwarzkopf, A., Heesemann, J., and Laufs, R.** (1994a) Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun* **62**: 3244-3253.
- Mack, D., Riedewald, J., Rohde, H., Magnus, T., Feucht, H.H., Elsner, H.A. et al.** (1999) Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect Immun* **67**: 1004-1008.

- Mack,D., Rohde,H., Harris,L.G., Davies,A.P., Horstkotte,M.A., and Knobloch,J.K.** (2006b) Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs* **29**: 343-359.
- Mack,D., Siemssen,N., and Laufs,R.** (1994b) Identification of a cell cluster associated antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis* which is functional related to intercellular adhesion. *Zentralbl Bakteriol Suppl* **26**: 411-413.
- Mack,D., Siemssen,N., and Laufs,R.** (1992) Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect Immun* **60**: 2048-2057.
- Madoff,L.C., Michel,J.L., Gong,E.W., Kling,D.E., and Kasper,D.L.** (1996) Group B streptococci escape host immunity by deletion of tandem repeat elements of the alpha C protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 4131-4136.
- Maira-Litran,T., Kropec,A., Abeygunawardana,C., Joyce,J., Mark,G., III, Goldmann,D.A., and Pier,G.B.** (2002) Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun* **70**: 4433-4440.
- Marrie,T.J., and Costerton,J.W.** (1984) Scanning and transmission electron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters. *J Clin Microbiol* **19**: 687-693.
- Marrie,T.J., Nelligan,J., and Costerton,J.W.** (1982) A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation* **66**: 1339-1341.
- McKenney,D., Pouliot,K.L., Wang,Y., Murthy,V., Ulrich,M., Doring,G. et al.** (1999) Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science* **284**: 1523-1527.
- Monk,A.B., and Archer,G.L.** (2007) Use of outer surface protein repeat regions for improved genotyping of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol* **45**: 730-735.
- Moreillon,P., Entenza,J.M., Francioli,P., McDevitt,D., Foster,T.J., Francois,P., and Vaudaux,P.** (1995) Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun* **63**: 4738-4743.
- Moretro,T., Hermansen,L., Holck,A.L., Sidhu,M.S., Rudi,K., and Langsrud,S.** (2003) Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5648-5655.
- Needham,C.A., and Stempsey,W.** (1984) Incidence, adherence, and antibiotic resistance of coagulase-negative *Staphylococcus species* causing human disease. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2**: 293-299.

- Nilsson, M., Frykberg, L., Flock, J.I., Pei, L., Lindberg, M., and Guss, B.** (1998) A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **66**: 2666-2673.
- Noble, W.C.** (1997) Staphylococcal carriage and skin and soft tissue infection. In *The staphylococci in human disease*. Crossley, K.B., and Archer, G.L. (eds). New York: Churchill Livingstone, pp. 401-412.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., and Kolter, R.** (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**: 49-79.
- Pantucek, R., Sedlacek, I., Petras, P., Koukalova, D., Svec, P., Stetina, V. et al.** (2005) *Staphylococcus simiae* sp. nov., isolated from South American squirrel monkeys. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 1953-1958.
- Patti, J.M.** (2004) A humanized monoclonal antibody targeting *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* **22 Suppl 1**: S39-S43.
- Peacock, S.J., Moore, C.E., Justice, A., Kantzanou, M., Story, L., Mackie, K. et al.** (2002) Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **70**: 4987-4996.
- Pei, L., and Flock, J.I.** (2001) Lack of *fbe*, the gene for a fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*, reduces its adherence to fibrinogen coated surfaces. *Microb Pathog* **31**: 185-193.
- Pei, L., Palma, M., Nilsson, M., Guss, B., and Flock, J.I.** (1999) Functional studies of a fibrinogen binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **67**: 4525-4530.
- Peters, G., Locci, R., and Pulverer, G.** (1981) Microbial colonization of prosthetic devices. II. Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters. *Zentralbl Bakteriolog Mikrobiol Hyg [B]* **173**: 293-299.
- Peters, G., Locci, R., and Pulverer, G.** (1982) Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis* **146**: 479-482.
- Petrelli, D., Zampaloni, C., D'Ercole, S., Prenna, M., Ballarini, P., Ripa, S., and Vitali, L.A.** (2006) Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **25**: 773-781.
- Pfeiffer, D., Jung, W., Fehske, W., Korte, T., Manz, M., Moosdorf, R., and Luderitz, B.** (1994) Complications of pacemaker-defibrillator devices: diagnosis and management. *Am Heart J* **127**: 1073-1080.

- Place,R.B., Hiestand,D., Gallmann,H.R., and Teuber,M.** (2003) *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. *Syst Appl Microbiol* **26**: 30-37.
- Probst,A.J., Hertel,C., Richter,L., Wassill,L., Ludwig,W., and Hammes,W.P.** (1998) *Staphylococcus condimenti* sp. nov., from soy sauce mash, and *Staphylococcus carnosus* (Schleifer and Fischer 1982) subsp. *utilis* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 3**: 651-658.
- Randrup,E.R.** (1995) Clinical experience with 180 inflatable penile prostheses. *South Med J* **88**: 47-51.
- Rennermalm,A., Nilsson,M., and Flock,J.I.** (2004) The fibrinogen binding protein of *Staphylococcus epidermidis* is a target for opsonic antibodies. *Infect Immun* **72**: 3081-3083.
- Ringberg,H., Thoren,A., and Bredberg,A.** (1991) Evaluation of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. A prospective clinical and microbiological study. *Scand J Infect Dis* **23**: 315-323.
- Robertsson,O., Knutson,K., Lewold,S., and Lidgren,L.** (2001) The Swedish Knee Arthroplasty Register 1975-1997: an update with special emphasis on 41,223 knees operated on in 1988-1997. *Acta Orthop Scand* **72**: 503-513.
- Roche,F.M., Massey,R., Peacock,S.J., Day,N.P., Visai,L., Speziale,P. et al.** (2003a) Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. *Microbiology* **149**: 643-654.
- Roche,F.M., Meehan,M., and Foster,T.J.** (2003b) The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. *Microbiology* **149**: 2759-2767.
- Rohde,H., Burandt,E.C., Siemssen,N., Frommelt,L., Burdelski,C., Wurster,S. et al.** (2007) Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* **28**: 1711-1720.
- Rohde,H., Burdelski,C., Bartscht,K., Hussain,M., Buck,F., Horstkotte,M.A. et al.** (2005) Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol* **55**: 1883-1895.
- Rohde,H., Kalitzky,M., Kroger,N., Scherpe,S., Horstkotte,M.A., Knobloch,J.K. et al.** (2004) Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol* **42**: 5614-5619.

- Rohde,H., Knobloch,J.K., Horstkotte,M.A., and Mack,D.** (2001b) Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* with polysaccharide intercellular adhesin synthesis: evidence for involvement of *icaADBC* genotype-independent factors. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **190**: 105-112.
- Rohde,H., Knobloch,J.K., Horstkotte,M.A., and Mack,D.** (2001a) Correlation of *Staphylococcus aureus* *icaADBC* genotype and biofilm expression phenotype. *J Clin Microbiol* **39**: 4595-4596.
- Rupp,M.E., and Archer,G.L.** (1994) Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* **19**: 231-243.
- Rupp,M.E., Fey,P.D., Heilmann,C., and Götz,F.** (2001) Characterization of the Importance of *Staphylococcus epidermidis* Autolysin and Polysaccharide Intercellular Adhesin in the Pathogenesis of Intravascular Catheter-Associated Infection in a Rat Model. *J Infect Dis* **183**: 1038-1042.
- Rupp,M.E., Ulphani,J.S., Fey,P.D., Bartscht,K., and Mack,D.** (1999a) Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect Immun* **67**: 2627-2632.
- Rupp,M.E., Ulphani,J.S., Fey,P.D., and Mack,D.** (1999b) Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infect Immun* **67**: 2656-2659.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual Cold Spring Harbour, N.Y.: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanzen,L., and Sundberg,M.** (1997) Periprosthetic low-grade hip infections. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in 23 cases. *Acta Orthop Scand* **68**: 461-465.
- Schwarzkopf,A., Karch,H., Schmidt,H., Lenz,W., and Heesemann,J.** (1993) Phenotypical and genotypical characterization of epidemic clumping factor-negative, oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **31**: 2281-2285.
- Sculco,T.P.** (1995) The economic impact of infected joint arthroplasty. *Orthopedics* **18**: 871-873.
- Shanks,R.M., Donegan,N.P., Graber,M.L., Buckingham,S.E., Zegans,M.E., Cheung,A.L., and O'Toole,G.A.** (2005) Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Infect Immun* **73**: 4596-4606.
- Sia,I.G., Berbari,E.F., and Karchmer,A.W.** (2005) Prosthetic joint infections. *Infect Dis Clin North Am* **19**: 885-914.

- Spanghel,M.J., Masri,B.A., O'Connell,J.X., and Duncan,C.P.** (1999) Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Am* **81**: 672-683.
- Spanghel,M.J., Younger,A.S., Masri,B.A., and Duncan,C.P.** (1998) Diagnosis of infection following total hip arthroplasty. *Instr Course Lect* **47**: 285-295.
- Sperber,W.H., and Tatini,S.R.** (1975) Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol* **29**: 502-505.
- Spergser,J., Wieser,M., Taubel,M., Rossello-Mora,R.A., Rosengarten,R., and Busse,H.J.** (2003) *Staphylococcus nepalensis* sp. nov., isolated from goats of the Himalayan region. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 2007-2011.
- Stoodley,P., Sauer,K., Davies,D.G., and Costerton,J.W.** (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**: 187-209.
- Sun,D., Accavitti,M.A., and Bryers,J.D.** (2005) Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**: 93-100.
- Takahashi,T., Satoh,I., and Kikuchi,N.** (1999) Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**: 725-728.
- Tenover,F.C., Arbeit,R.D., Goering,R.V., Mickelsen,P.A., Murray,B.E., Persing,D.H., and Swaminathan,B.** (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**: 2233-2239.
- Timmerman,C.P., Fleer,A., Besnier,J.M., De Graaf,L., Cremers,F., and Verhoef,J.** (1991) Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect Immun* **59**: 4187-4192.
- Toledo-Arana,A., Merino,N., Vergara-Irigaray,M., Debarbouille,M., Penades,J.R., and Lasa,I.** (2005) *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system. *J Bacteriol* **187**: 5318-5329.
- Trulzsch,K., Rinder,H., Trcek,J., Bader,L., Wilhelm,U., and Heesemann,J.** (2002) "*Staphylococcus pettenkoferi*," a novel staphylococcal species isolated from clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* **43**: 175-182.
- Tsukayama,D.T., Estrada,R., and Gustilo,R.B.** (1996) Infection after total hip arthroplasty. A study of the treatment of one hundred and six infections. *J Bone Joint Surg Am* **78**: 512-523.

- Tu Quoc,P.H., Genevoux,P., Pajunen,M., Savilahti,H., Georgopoulos,C., Schrenzel,J., and Kelley,W.L.** (2007) Isolation and characterization of biofilm formation-defective mutants of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **75**: 1079-1088.
- Tung,H., Guss,B., Hellman,U., Persson,L., Rubin,K., and Ryden,C.** (2000) A bone sialo-protein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. *Biochem J* **345 Pt 3**: 611-619.
- Vadyvaloo,V., and Otto,M.** (2005) Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices. *Int J Artif Organs* **28**: 1069-1078.
- Vandecasteele,S.J., Peetermans,W.E., Merckx,R., Rijnders,B.J., and Van Eldere,J.** (2003a) Reliability of the *ica*, *aap* and *atlE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. *Clin Microbiol Infect* **9**: 114-119.
- Vandecasteele,S.J., Peetermans,W.E., Merckx,R., and Van Eldere,J.** (2003b) Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during in vitro and in vivo foreign body infections. *J Infect Dis* **188**: 730-737.
- Vaudaux,P., Pittet,D., Haerberli,A., Huggler,E., Nydegger,U.E., Lew,D.P., and Waldvogel,F.A.** (1989) Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin. *J Infect Dis* **160**: 865-875.
- Veenstra,G.J., Cremers,F.F., van Dijk,H., and Flier,A.** (1996) Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **178**: 537-541.
- Vernachio,J.H., Bayer,A.S., Ames,B., Bryant,D., Prater,B.D., Syribeys,P.J. et al.** (2006) Human immunoglobulin G recognizing fibrinogen-binding surface proteins is protective against both *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 511-518.
- Vernozy-Rozand,C., Mazuy,C., Meugnier,H., Bes,M., Lasne,Y., Fiedler,F. et al.** (2000) *Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 4**: 1521-1527.
- von Eiff,C., Jansen,B., Kohnen,W., and Becker,K.** (2005) Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs* **65**: 179-214.
- Vuong,C., Gerke,C., Somerville,G.A., Fischer,E.R., and Otto,M.** (2003) Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* **188**: 706-718.
- Vuong,C., Kocianova,S., Voyich,J.M., Yao,Y., Fischer,E.R., DeLeo,F.R., and Otto,M.** (2004a) A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* **279**: 54881-54886.

- Vuong,C., Voyich,J.M., Fischer,E.R., Braughton,K.R., Whitney,A.R., DeLeo,F.R., and Otto,M.** (2004b) Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol* **6**: 269-275.
- Wang,I.W., Anderson,J.M., and Marchant,R.E.** (1993) Platelet-mediated adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to hydrophobic NHLBI reference polyethylene. *J Biomed Mater Res* **27**: 1119-1128.
- Wang,X., Preston,J.F., III, and Romeo,T.** (2004) The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol* **186**: 2724-2734.
- Weems,J.J., Jr., Steinberg,J.P., Filler,S., Baddley,J.W., Corey,G.R., Sampathkumar,P. et al.** (2006) Phase II, randomized, double-blind, multicenter study comparing the safety and pharmacokinetics of tefibazumab to placebo for treatment of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 2751-2755.
- Weidenmaier,C., Kristian,S.A., and Peschel,A.** (2003) Bacterial resistance to antimicrobial host defenses--an emerging target for novel antiinfective strategies? *Curr Drug Targets* **4**: 643-649.
- Weinstein,M.P., Murphy,J.R., Reller,L.B., and Lichtenstein,K.A.** (1983) The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. II. Clinical observations, with special reference to factors influencing prognosis. *Rev Infect Dis* **5**: 54-70.
- Widmer,A.F.** (2001) New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. *Clin Infect Dis* **33 Suppl 2**: S94-106.
- Williams,R.J., Henderson,B., Sharp,L.J., and Nair,S.P.** (2002) Identification of a Fibronectin-Binding Protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **70**: 6805-6810.
- Yao,Y., Sturdevant,D.E., Villaruz,A., Xu,L., Gao,Q., and Otto,M.** (2005) Factors characterizing *Staphylococcus epidermidis* invasiveness determined by comparative genomics. *Infect Immun* **73**: 1856-1860.
- Younger,J.J., Christensen,G.D., Bartley,D.L., Simmons,J.C., and Barrett,F.F.** (1987) Coagulase-negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts: importance of slime production, species identification, and shunt removal to clinical outcome. *J Infect Dis* **156**: 548-554.
- Zhang,Y.Q., Ren,S.X., Li,H.L., Wang,Y.X., Fu,G., Yang,J. et al.** (2003) Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol Microbiol* **49**: 1577-1593.

Ziebuhr,W., Heilmann,C., Götz,F., Meyer,P., Wilms,K., Straube,E., and Hacker,J. (1997) Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun* **65**: 890-896.

Ziebuhr,W., Krimmer,V., Rachid,S., Löbner,I., Götz,F., and Hacker,J. (1999) A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element *IS256*. *Mol Microbiol* **32**: 345-356.

9 Anhang

9.1 Bakterienstammsammlung

Tab. 12 Übersicht der Bakterienstammsammlung

| Isolat ^a | | Spezies ^b | Gelenk |
|---------------------|---|-----------------------------------|--------|
| 01 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| 03 | a | <i>Staphylococcus lugdunensis</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus lugdunensis</i> | Knie |
| 04 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| 06 | a | <i>Staphylococcus capitis</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus capitis</i> | Knie |
| 07 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| 08 | a | <i>Staphylococcus aureus</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus aureus</i> | Hüfte |
| 09 | a | <i>Staphylococcus aureus</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus aureus</i> | Hüfte |
| 10 | a | <i>Staphylococcus capitis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus capitis</i> | Hüfte |
| 11 | a | <i>Staphylococcus aureus</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus aureus</i> | Knie |
| 12 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| 13 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| 14 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| 15 | a | <i>Staphylococcus aureus</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus aureus</i> | Hüfte |
| 16 | a | <i>Staphylococcus aureus</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus aureus</i> | Hüfte |
| 18 | a | <i>Staphylococcus capitis</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus capitis</i> | Knie |

| | | | |
|----|---|------------------------------------|-------|
| 19 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| 20 | a | <i>Staphylococcus lugdunensis</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus lugdunensis</i> | Knie |
| 22 | a | <i>Staphylococcus aureus</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus aureus</i> | Hüfte |
| 24 | a | <i>Staphylococcus aureus</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus aureus</i> | Hüfte |
| 25 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| 26 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| 27 | a | <i>Staphylococcus warneri</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus warneri</i> | Knie |
| 28 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| 29 | a | <i>Staphylococcus aureus</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus aureus</i> | Knie |
| 32 | a | <i>Staphylococcus aureus</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus aureus</i> | Hüfte |
| 33 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| 35 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| 36 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| 37 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| 38 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| 39 | a | <i>Staphylococcus aureus</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus aureus</i> | Knie |
| 40 | a | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | Knie |
| 41 | a | <i>Staphylococcus aureus</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus aureus</i> | Hüfte |
| 42 | a | <i>Staphylococcus aureus</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus aureus</i> | Knie |
| 43 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| 44 | a | <i>Staphylococcus caprae</i> | Hüfte |

| | | | |
|----|---|-----------------------------------|-------|
| | b | <i>Staphylococcus caprae</i> | Hüfte |
| 45 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| 46 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| 47 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| 48 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| 51 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| 54 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| 55 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| 56 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| 57 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| 58 | a | <i>Staphylococcus capitis</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus capitis</i> | Knie |
| 59 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| 60 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| 62 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Knie |
| 63 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| 65 | a | <i>Staphylococcus aureus</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus aureus</i> | Hüfte |
| 66 | a | <i>Staphylococcus aureus</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus aureus</i> | Knie |
| 68 | a | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| | b | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hüfte |
| 69 | a | <i>Staphylococcus lugdunensis</i> | Knie |
| | b | <i>Staphylococcus lugdunensis</i> | Knie |

^a Von jedem Patienten lagen zwei Isolate vor, die aus einem Punktat beziehungsweise einem intraoperativen Abstrich angezüchtet wurden. Das jeweilige Punktatisolat ist durch den Zusatz „a“, das korrespondierende intraoperative Isolat durch den Zusatz „b“ gekennzeichnet.

^b Die in der Liste hinterlegten Stammpaare eines Patienten sind klonal identisch (Nachweis mittels Pulsfeldgelelektrophorese, siehe Ergebnisse). Daher wurde nicht in allen Fällen eine biochemische Differenzierung beider Isolate vorgenommen.

9.2 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A ₅₇₀ | Absorption gemessen bei einer Wellenlänge von 570 nm |
| CFU | koloniebildende Einheiten (englisch: <i>colony forming units</i>) |
| cm | Zentimeter |
| Da | Dalton |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (englisch: <i>desoxyribonucleic acid</i>) |
| dNTP | <u>D</u> esoxy- <u>N</u> ukleotidyl- <u>T</u> riphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | englisch <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| EZM | <u>e</u> xtrazelluläre <u>M</u> atrixmoleküle |
| <i>ica</i> | interzelluläre Adhäsion (<i>intercellular adhesion</i>) |
| IS256 | Insertionselement 256 |
| M | Mol |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| MSCRAMM | englisch <i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i> |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: <i>phosphate buffered saline</i>) |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (englisch: <i>polymerase chain reaction</i>) |
| PFGE | <u>P</u> uls <u>f</u> eld <u>g</u> e <u>l</u> ektrophorese |
| PIA | interzelluläres Polysaccharid Adhäsion (englisch: <i>polysaccharide intercellular adhesin</i>) |
| RNA | Ribonukleinsäure (englisch: <i>ribonucleic acid</i>) |
| SERAM | englisch <i>secretable expanded repertoire adhesive proteins</i> |
| THE | <u>T</u> otale <u>H</u> üft- <u>E</u> ndoprothese |
| TKE | <u>T</u> otale <u>K</u> nie- <u>E</u> ndoprothese |
| TSB BBL | Trypton Soja Brühe (englisch: <i>trypticase soy broth</i>) der Firma Becton Dickinson, Cockseyville, MD, USA |

| | |
|------|--------------------------------------------------------------|
| TSBØ | Trypton Soja Brühe ohne Glucose |
| U | enzymatische Einheit (englisch: <i>unit</i>) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (englisch: <i>rounds per minute</i>) |
| s | Sekunde |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| w/v | Gewicht pro Volumen |

9.3 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abb.1 Elektronenmikroskopisches Bild eines von <i>S. epidermidis</i> 1457 synthetisierten Biofilms _____ | 16 |
| Abb. 2 Schematische Darstellung des Modells der Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i> _____ | 17 |
| Abb. 3 Schematische Darstellung des interzellulären Polysaccharid-Adhäsins (<i>polysaccharid intercellular adhesin</i> PIA) _____ | 21 |
| Abb. 4 Schematische Darstellung des <i>Accumulation associated protein</i> (Aap) von <i>S. epidermidis</i> 5179 _____ | 24 |
| Abb. 5 Klonalitätsprüfung von <i>S. epidermidis</i> Isolaten aus Endoprotheseninfektionen _____ | 46 |
| Abb. 6 Darstellung der Prävalenz Virulenz-assoziiierter Gene der <i>S. aureus</i> Stämme von periprothetischen Infektionen nach TKE und THE _____ | 48 |
| Abb. 7 Darstellung des Einflusses von Trypsin und Dispersin B auf repräsentative Biofilme von <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> _____ | 50 |
| Abb. 8 Range Plot der Biofilmdesintegration durch Dispersin B und Trypsin bei <i>S. aureus</i> _____ | 51 |
| Abb. 9 Darstellung der Prävalenz Virulenz-assoziiierter Gene der <i>S. epidermidis</i> Stämme von periprothetischen Infektionen nach TKE und THE _____ | 53 |
| Abb. 10 Range Plot der Biofilmdesintegration durch Dispersin B und Trypsin bei <i>S. epidermidis</i> _____ | 55 |
| Abb. 11 Relative Inhibition der Biofilmbildung _____ | 57 |
| Abb. 12 Vergleich der Domäne-B von <i>aap</i> bei korrespondierenden <i>S. epidermidis</i> Stämmen _____ | 58 |
| Abb. 13 Darstellung der Prävalenz Virulenz-assoziiierter Gene der KNS Stämme von periprothetischen Infektionen nach TKE und THE _____ | 60 |
| | |
| Tab. 1 Implantierte Fremdmaterialien und die Häufigkeit ihrer Anwendung _____ | 6 |
| Tab. 2 Epidemiologie Implantat-assoziiierter Infektionen: typische Erreger _____ | 8 |
| Tab. 3 Häufigkeit verschiedener Bakterienspezies bei Endoprotheseninfektionen _____ | 10 |
| Tab. 4 Funktionell an den einzelnen Phasen der Staphylokokken-Biofilmbildung beteiligte Faktoren _____ | 20 |
| Tab. 5 Übersicht über verwendete Laborgeräte _____ | 27 |
| Tab. 6 Übersicht der verwendeten Bakterienstämme und deren Charakteristika _____ | 31 |
| Tab. 7 Übersicht der verwendeten Primer _____ | 32 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tab. 8 Übersicht über die Speziesverteilung der Stammsammlung_____ | 45 |
| Tab. 9 Biofilm Phänotyp und <i>icaADBC</i> Genotyp der <i>S. aureus</i> Stämme von periprothetischen Infektionen nach TKE und THE_____ | 49 |
| Tab. 10 Biofilm Phänotyp und <i>icaADBC</i> Genotyp der <i>S. epidermidis</i> Stämme von periprothetischen Infektionen nach TKE und THE_____ | 54 |
| Tab. 12 Biofilm Phänotyp und <i>icaADBC</i> Genotyp der KNS Stämme von periprothetischen Infektionen nach TKE und THE_____ | 59 |
| Tab. 13 Übersicht der Bakterienstammsammlung_____ | 90 |

9.4 Curriculum vitae

Eike-Christian Burandt

| | |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Geburtsdatum: | 29. September 1977 |
| Geburtsort: | Hamburg |
| Anschrift: | Lianenweg 11 22529 Hamburg |
| Email: | e.burandt@uke.uni-hamburg.de |
| Familienstand: | ledig |
| 08/1984-06/1988 | Grundschule Großburgwedel |
| 08/1988-06/1990 | Orientierungsstufe Großburgwedel |
| 08/1990-06/1997 | Gymnasium Großburgwedel |
| 06/1990 | Abitur |
| 07/1997-04/1998 | Wehrdienst Wehrbereichskommando II, Hannover |
| 05/1998-08/1998 | Pflegepraktikum Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Großburgwedel |
| 09/1998-12/1998 | Pflegepraktikum Orthopädie, Krankenhaus Annastift, Hannover |
| 04/1999-04/2006 | Studium der Humanmedizin Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf |
| 03/2001 | Physikum |
| 03/2002 | I. Staatsexamen |
| 03/2005 | II. Staatsexamen |
| 04/2006 | III. Stastsexamen |
| 06/2006-04/2007 | Assistenzarzt in der II. Med. Abteilung, Gastroenterologie und Hepatologie, Albertinen Krankenhaus Hamburg |
| Seit 06/2007 | Assistenzarzt am Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf |

Hamburg im Oktober 2007

9.5 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

1. H. Rohde, **E. Burandt**, N. Siemssen, L. Frommelt, C. Burdelski, S. Wurster, S. Scherpe, A. P. Davies, L. G. Harris, M. A. Horstkotte, J. K.-M. Knobloch, C. Rangunath, J. B. Kaplan und D. Mack. 2007. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* 28: 1711 – 1720.

Publizierte Abstracts

1. H. Rohde, **E. Burandt**, L. Frommelt, N. Siemssen, M. A. Horstkotte, M. Kalitzky, S. Wurster, S. Scherpe, J. K.-M. Knobloch, J. Kaplan und D. Mack. 2005. Comparison of virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* from prosthetic joint infections reveals evidence for differential importance of Polysaccharide intercellular adhesion and protein factors in biofilm formation. Posterpräsentation im Rahmen der 57. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 25.9. – 29.9.2005 in Göttingen.
2. H. Rohde, **E. Burandt**, L. Frommelt, N. Siemssen, C. Burdelski, C.-J. Wang, S. Scherpe, J. K.-M. Knobloch, J. Kaplan und D. Mack. 2006. Differential importance of protein and polysaccharide intercellular adhesion mediated biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* from prosthetic joint infections. Vortrag im Rahmen des 16. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1.4. – 4.4.2006 in Nizza.

9.6 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. R. Laufs und Herrn Prof. Dr. med. M. Aepfelbacher möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. D. Mack, dem Leiter der Arbeitsgruppe, danke ich für die Überlassung des Themas. Für die ständige Bereitschaft zur Beratung, Gelegenheit zur Diskussion und die persönliche Betreuung möchte ich mich ebenfalls bedanken. Herrn PD Dr. med. I. Sobottka danke ich für die Übernahme der Aufgaben des Doktorvaters nach der Berufung von Herrn Prof. Mack an die Universität von Wales, Swansea.

Mein besonderer Dank für die umfassende Betreuung während der gesamten Doktorarbeit gilt Herrn Dr. med. Holger Rohde, meinem ständig geduldigen und hilfsbereiten Ansprechpartner inner- und außerhalb des Labors. Seine unermüdliche, durchweg kompetente und vor allem freundschaftliche Unterstützung sicherte mir eine optimale Betreuung.

Ich danke meinen Eltern Helge und Norbert Burandt, meinem Bruder Arne Burandt und meinen Freunden für den privaten Rückhalt.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. med. H.-H. Feucht und Herrn PD Dr. med. B. Zöllner für die Hilfe bei der statistischen Auswertung von Daten.

Abschließend möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden der Arbeitsgruppe für die schöne gemeinsame Zeit innerhalb und außerhalb des Labors bedanken.

Alle diejenigen, die ich versehentlich vergessen habe namentlich zu erwähnen, bitte ich dieses zu entschuldigen.

9.7 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Eike-Christian Burandt

Hamburg im Oktober 2007